

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos inmunológicos relacionados con la progresión
asociada a la edad en la esclerosis múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Amalia Tejeda Velarde

Directora

Luisa María Villar Guimerans

Madrid

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa de Investigación Biomédica



**“Mecanismos inmunológicos relacionados
con la progresión asociada a la edad en la
Esclerosis Múltiple”**

Amalia Tejeda Velarde

TESIS DOCTORAL

Directora:

Dra. Luisa María Villar Guimerans

Madrid 2019



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa Investigación Biomédica

**“Mecanismos inmunológicos relacionados
con la progresión asociada a la edad en la
Esclerosis Múltiple”**

Amalia Tejeda Velarde

Licenciada en Bioquímica y Biología

Directora:

Dra. Luisa María Villar Guimerans

Jefa del Servicio de Inmunología

Hospital Universitario Ramón y Cajal



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Amalia Tejeda Velarde
con número de DNI/NIE/Pasaporte 52965845L, estudiante en el Programa
de Doctorado Investigación Biomédica,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Mecanismos inmunológicos relacionados con la progresión asociada a la edad en la Esclerosis
Múltiple

y dirigida por: Dra. Luisa María Villar Guimerans

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 3 de junio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



Dña. Luisa María Villar Guimerans, Doctora en Farmacia y Jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

CERTIFICA: que Dña. Amalia Tejeda Velarde ha realizado bajo su dirección su Tesis Doctoral titulada: **“Mecanismos inmunológicos relacionados con la progresión asociada a la edad en la Esclerosis Múltiple”**

Revisada la misma, reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Doctor, por lo que doy mi conformidad para su presentación a tal fin.

En Madrid, a 22 de mayo de 2019

Fdo. Dña. Luisa María Villar Guimerans

*A Fernando, mis padres
y mi hermano.*

AGRADECIMIENTOS

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Poseidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo...*

Cuando emprendí el viaje de mi tesis doctoral, rogué justo lo contrario que dice el poema, pedí en mis adentros que el camino fuera fácil y corto y que no exigiera todo de mí, hasta el punto de renovarme por completo. Sin embargo, ahora puedo coincidir con el poema, pues este largo viaje lleno de aventuras y experiencias me ha permitido evolucionar en distintos ámbitos, tanto profesionales como personales. Por ello, el primer agradecimiento va dirigido a mi directora, la Dra. Luisa María Villar Guimerans, quien me regaló la posibilidad de hacer este viaje. Gracias por guiarme, a pesar de mi insistencia. Gracias por apartar de mí a los lestrigones, los cíclopes y al colérico Poseidón, puesto que sólo el tesón, el bien hacer y el entusiasmo permiten avanzar en este arduo, pero fascinante viaje de la investigación.

En segundo lugar quiero agradecer su labor a mi tutor, el Dr. José Ramón Regueiro, pues aunque no hemos compartido las durezas de este viaje, su emoción por la Inmunología, que toca espíritu y cuerpo, ha impregnado de alguna manera a este trabajo y a mí misma.

Además, no puedo olvidar a mi profesor de Biología, el Dr. Francisco Blázquez, puesto que su pensar elevado y sus horas de dedicación fuera de las aulas orientaron mi rumbo hacia la Biología.

*Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Poseidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tu alma ante ti...*

Y aunque no aparecieron ni los lestrigones ni los cíclopes, sí llegó la pregunta de investigación desde los Servicios de Neurología e Inmunología. Concretamente desde

la Unidad de Esclerosis Múltiple. Así, a los neurólogos de dicha Unidad (Dr. José Carlos Álvarez-Cermeño, Dra. Lucienne Costa-Frossard, Dra. Susana Sainz de la Maza y Dr. Enric Monreal) y al personal de investigación (Carmen, Silvia, Nacho, Noelia, Sonia) les agradezco su compromiso con la investigación, su apoyo y su disponibilidad. No obstante, debo agradecer también a los otros miembros de la Unidad de Esclerosis Múltiple, los pacientes, quienes a pesar de que su alma pueda erguir ante ellos a estos gigantes, permiten que ahondemos en el conocimiento de su enfermedad, aunque en muchas ocasiones eso no suponga facilitar su propio viaje, sino el de aquellos que vienen por detrás.

Pide que el camino sea largo.

Que muchas sean las mañanas de verano

en que llegues -¡con qué placer y alegría!-

a puertos nunca vistos antes...

Pide que el camino sea largo y repleto de placenteros atracos en puertos nuevos. Así ha sido mi viaje por el Servicio de Inmunología, un viaje que me ha permitido llegar a puertos nunca vistos en los que aprender y expandir mis horizontes. Por ello, quiero agradecer a todos los miembros del Servicio de Inmunología que me hayan facilitado superar con placer y alegría cada uno de los pequeños o grandes retos que surgen en el día a día de un Servicio Clínico.

Quiero destacar en primer lugar a aquellos con los que compartí mis años como residente: Dani, Silvia, Cristina, Carla, Paula, Miguel Ángel, Israel, Andrés, Paulette, Carlota, Paloma y Nacho. El primero y el último suponen la total extensión de mi residencia, pues el primero fue mi guía y al último le pido disculpas si no he sabido ofrecerle todo el cariño y apoyo que debe brindar un R mayor. No obstante, quisiera destacar a otros dos residentes: Israel y Paula, pues ambos han sido y continúan siendo los dos mejores compañeros posibles en este viaje profesional y sobre todo personal.

Además, quisiera agradecer al personal Facultativo que hayan aportado sus grandes conocimientos a este viaje. Muchas gracias Dra. Luisa María Villar, Dra. Ángela Carrasco, Dra. Garbiñe Roy, Dr. Ernesto Roldán, Dra. Eulalia Rodríguez, Dra. Mercedes Espiño, Dr. José Luis Castañer, Dra. Ana de Andrés y Dr. Javier Coll. Además, quiero agradecer al personal técnico sus enseñanzas acerca de cómo trabajar en un laboratorio y sobre todo las experiencias y conversaciones compartidas. Muchas gracias Marta, Pilar, Chus, María, Isabel, Mercedes, Carmen, Lola, Ana, Carmen y M^a Tere. Por último, no me puedo olvidar de Raquel e Inma, quienes aportaron consejos derivados de sus experiencias previas como residentes y por supuesto los nuevos residentes (Nieves, Claudia y Roberto), pues ellos traen los nuevos aires que permiten reanudar el viaje.

*Detente en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas...*

Durante tu viaje hazte con las más hermosas mercancías posibles: los amigos. Y a pesar de que debería haberme detenido más tiempo en los emporios de Fenicia, siempre habéis estado ahí, acompañándome en cada una de las etapas de la vida. Muchas gracias: Noelia, Raquel, María del Mar y Estrella. Y muchas gracias también a quienes ahora comparten sus viajes Jaime, Pablo y Adrián, ya que han incrementado, si cabe aún más, el valor de estas hermosas mercancías.

*Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios...*

Aunque no fui a Egipto, sí fui a Boston, a aprender de los sabios que pueblan sus universidades y laboratorios. Quiero agradecer al Dr. Francisco J Quintana que me abriera las puertas de su laboratorio, que me acogiera y me permitiera aprender tanto de él, como del resto de sabios que componen su equipo. Por tanto, muchas gracias al Dr. Quintana y a todos los miembros de su laboratorio, por los buenos momentos compartidos y por su disposición para ayudar y enseñar. No obstante, quisiera destacar a Lili y Cristina, pues ellas fueron los dos faros de esa estancia, ya que desde el primer día se convirtieron en mi guía y apoyo, a la vez que me dieron el último aliento para poder continuar con este viaje.

*Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuánto ganaste en el camino
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca...*

Quiero agradecer a mis abuelos Victoriano, Guadalupe, Antonio y Candela, que compartieran conmigo las riquezas de sus largos viajes y que gracias a su esfuerzo y dedicación quienes los sucedemos podemos tener un periplo mucho más placentero. Así mismo, quiero agradecer a mis tíos (Diego, Fulgen, Lupe, Ángel, Ángeles, Juan

Antonio, Fernando y María) y primos (Diego, Lola, Isabel, Ángel, Juan Antonio, Jaime, Mónica y Fernando Jesús) el enorme cariño aportado a este viaje. Y sobre todo quiero mostrar mi agradecimiento a mi familia. A mis padres, Antonio y Amalia, pues todo lo que soy se lo debo a ellos, desde el simple hecho de caminar hasta el haber sido capaz de escribir esta tesis, y a mi hermano Antonio y su novia Laura, pues ambos llenan de alegría cada una de las reuniones familiares.

Por último, quiero agradecer a aquellos con los que comparto diariamente las asperezas y benevolencias de este viaje. Gracias a Toy, por esperarme en la puerta y recordarme la importancia de una simple caricia. Y finalmente, mi mayor agradecimiento se lo dedico a Fernando, por su apoyo incondicional, su inestimable ayuda y comprensión y por aceptar el difícil reto de compartir esta travesía conmigo. Ojalá nuestro viaje dure muchos años y lleguemos a Ítaca cargados de riquezas compartidas.

Ítaca te brindó tan hermoso viaje.

Sin ella no habrías emprendido el camino.

Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.

*Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Ítacas.*

Constantino Cavafis (1863-1933)

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	21
RESUMEN.....	27
1.INTRODUCCIÓN.....	39
1.1 Aspectos históricos.....	42
1.2 Epidemiología.....	43
1.3 Etiología.....	44
1.3.1 Factores genéticos.....	44
1.3.2 Factores ambientales y de estilo de vida.....	46
1.3.3 Epigenética.....	49
1.4 Formas clínicas.....	51
1.4.1 Síndrome Neurológico Aislado (SNA).....	52
1.4.2 Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (EMRR).....	52
1.4.3 Esclerosis Múltiple Progresiva.....	52
1.5 Diagnóstico.....	53
1.5.1 Resonancia Magnética (RM).....	54
1.5.2 Potenciales evocados.....	55
1.5.3 Estudio del LCR en el diagnóstico.....	55
1.6 Neuropatología.....	56
1.6.1 Lesiones focales de la sustancia blanca.....	57
1.6.2 Desmielinización en la sustancia gris.....	57
1.6.3 Lesiones difusas en las sustancias blanca y gris aparentemente normales.....	58
1.7 Fisiopatología.....	58
1.7.1 Linfocitos T CD4.....	59

1.7.2	Linfocitos T CD8.....	61
1.7.3	Linfocitos B.....	62
1.7.4	Células <i>Natural Killer</i> (NK).....	63
1.7.5	Monocitos-macrófagos y células de la microglía.....	64
1.7.6	Astroцитos.....	65
1.8	Tratamiento.....	66
1.9	Biomarcadores en Esclerosis Múltiple.....	69
1.9.1	Bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE).....	70
1.9.2	Cadena ligera de los neurofilamentos (NF-L).....	71
1.9.3	<i>Chitinase 3-like 1</i> (CHI3L1).....	72
1.9.4	Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP).....	73
1.9.5	Poblaciones celulares en LCR y sangre periférica.....	73
1.10	Inmunosenescencia.....	75
2.	HIPÓTESIS.....	79
3.	OBJETIVOS.....	85
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
4.1	Pacientes y materiales.....	91
4.1.1	Pacientes y muestras biológicas.....	91
4.1.2	Cuantificación de IgG, IgM y albúmina.....	92
4.1.3	Detección de bandas oligoclonales.....	92
4.1.4	Estudio de poblaciones leucocitarias de LCR y sangre periférica....	94
4.1.4.1	Inmunofenotipo de LCR.....	95
4.1.4.2	Inmunofenotipo de sangre periférica.....	96
4.1.4.3	Producción de citoquinas intracelulares.....	96
4.1.5	Determinación de factores solubles en LCR.....	97

4.1.6	Cuantificación de anti-CMV IgG en suero.....	97
4.2	Métodos.....	98
4.2.1	Cuantificación de IgG, IgM y albúmina.....	98
4.2.2	Detección de bandas oligoclonales de IgG (BOCG).....	98
4.2.3	Detección de bandas oligoclonales de IgM (BOCM).....	100
4.2.4	Detección de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE).....	100
4.2.5	Estudio de poblaciones leucocitarias en LCR.....	101
4.2.5.1	Detección intracelular de citoquinas por parte de los linfocitos T y B.....	106
4.2.5.2	Producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos.....	109
4.2.6	Estudio de poblaciones mononucleares en sangre periférica.....	110
4.2.7	Determinación de factores solubles en LCR.....	112
4.2.8	Cuantificación de anti-CMV IgG en suero.....	113
4.2.9	Análisis estadístico.....	113
5	RESULTADOS.....	117
5.1	Datos demográficos.....	119
5.2	Análisis de las poblaciones leucocitarias presentes en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con Esclerosis Múltiple.....	120
5.2.1	Linfocitos T CD4.....	121
5.2.2	Linfocitos T CD8.....	123
5.2.3	Linfocitos B.....	125
5.2.4	Células NK.....	128

5.2.5	Monocitos.....	129
5.3	Estudio de la edad en la cual los cambios inmunológicos se manifiestan con claridad.....	133
5.4	Clasificación de los pacientes en función de las BOCM-LE.....	135
5.4.1	Linfocitos T CD4.....	140
5.4.2	Linfocitos T CD8.....	141
5.4.3	Linfocitos B.....	144
5.4.4	Células NK.....	149
5.4.5	Monocitos.....	150
5.4.6	Clasificación en mayores y menores de 45 años.....	154
5.5	Análisis de Factores solubles presentes en el LCR.....	162
5.6	Estudio de Biomarcadores en sangre periférica.....	170
5.6.1	Anticuerpos anti-CMV IgG.....	170
5.6.2	Análisis de poblaciones mononucleares presentes en la sangre periférica de los pacientes con Esclerosis Múltiple.....	172
5.7	Relaciones entre los datos clínicos y las variables inmunológicas analizadas.....	178
5.7.1	Lesiones captantes y variables inmunológicas.....	179
5.7.2	EDSS y variables inmunológicas.....	180
5.7.3	MSSS y variables inmunológicas.....	183
6.DISCUSIÓN	187
6.1	Inmunosenescencia.....	190
6.1.1	Poblaciones leucocitarias presentes en el LCR.....	191
6.1.1.1	Linfocitos T CD4.....	194

6.1.1.2	Linfocitos T CD8.....	197
6.1.1.3	Linfocitos B.....	199
6.1.1.4	Células NK.....	202
6.1.1.5	Monocitos.....	203
6.1.2	Factores solubles del LCR.....	207
6.1.3	Estudio de biomarcadores de sangre periférica.....	212
6.1.3.1	Anticuerpos anti-CMV IgG.....	212
6.1.3.2	Poblaciones mononucleares de sangre periférica.....	212
6.1.4	Relaciones entre los datos clínicos y las variables inmunológicas.....	215
7.CONCLUSIONES.....		221
8.BIBLIOGRAFÍA.....		225
9.ANEXO.....		249

Artículos publicados durante la elaboración de la Tesis:

Tejeda-Velarde A, Costa-Frossard L, Sainz de la Maza S, Carrasco Á, Espiño M, Picón C, Toboso I, Walo PE, Lourido D, Muriel A, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. *Clinical usefulness of prognostic biomarkers in optic neuritis*. Eur J Neurol. 2018 Apr; 25(4):614-618.

Medina S, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, Monreal E, **Tejeda-Velarde A**, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. *Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients*. Ann Clin Transl Neurol. 2019 Jan 15;6(2):355-363.

Sainz de la Maza S, Medina S, Villarrubia N, Costa-Frossard L, Monreal E, **Tejeda-Velarde A**, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. *Factors associated with dimethyl fumarate-induced lymphopenia*. J Neurol Sci. 2019 Mar 15;398:4-8.

Cuello JP, Martínez Ginés ML, Kuhle J, García Domínguez JM, Lozano Ros A, Romero Delgado F, Higuera Y, Meldaña Rivera A, Goicochea Briceño H, García-Tizon Larroca S, de-León Ruiz J, Michalak Z, Barro C, Álvarez Lafuente R, Medina Heras S, Fernández Velasco JI, **Tejeda-Velarde A**, Domínguez-Mozo MI, Muriel A, de Andrés C, Villar LM. *Neurofilament light chain levels in pregnant multiple sclerosis patients: a prospective cohort study*. Eur J Neurol. 2019 Apr 12. [Epub ahead of print]

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

anti-CMV IgG	Inmunoglobulina G anti Citomegalovirus
APC	Aloficocianina
BAFF	Factor Activador de Células B
BHE	Barrera Hematoencefálica
BOC	Bandas Oligoclonales
BOCG	Bandas Oligoclonales de Inmunoglobulina G
BOCM	Bandas Oligoclonales de Inmunoglobulina M
BOCM-LE	Bandas Oligoclonales de Inmunoglobulina M lípido-específicas
BV	Violeta Brillante
CCR7	Receptor de quimiocinas C-C tipo 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHI3L1	<i>Chitinase 3-like 1</i>
CMV	Citomegalovirus
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
Cy	Cianina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferasa
DS	Desviación estándar
DSS	<i>Disability Status Scale</i>
EAE	Encefalitis Autoinmune Experimental
EBNA-1	Antígeno Nuclear 1 del Virus de Epstein-Barr
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima
EM	Esclerosis Múltiple
EMPP	Esclerosis Múltiple Primaria-Progresiva
EMRR	Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple Secundaria-Progresiva
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FoxP3	<i>Forkhead box Protein 3</i>
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
HERVs	Retrovirus Endógenos Humanos
HHV-6	Herpesvirus Humano 6
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
ILCs	Células linfocíticas innatas
IV	<i>Index Value</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva
MC	Memoria Central
ME	Memoria Efectora
miRNAs	micro ácidos ribonucleicos
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MSSS	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
NF-H	Cadena pesada de los Neurofilamentos
NF-L	Cadena ligera de los Neurofilamentos
NF-M	Cadena mediana de los Neurofilamentos
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NMOSD	Trastornos del Espectro de la Neuromielitis Óptica
OR	<i>Odds Ratio</i>
PD-1	Muerte programada 1

PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PE	Ficoeritrina
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Complex Protein</i>
RM	Resonancia Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROR γ t	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor-γt</i>
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SIMOA	<i>Single Molecule Array Technology</i>
SNA	Síndrome Neurológico Aislado
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRA	Síndrome Radiológico Aislado
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TCR	Complejo del receptor del linfocito T
TD	Terminalmente Diferenciadas
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRECs	Círculos de Escisión del receptor de células T
TRM	Linfocitos T de Memoria Residente
UV	Ultravioleta

RESUMEN

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA PROGRESIÓN ASOCIADA A LA EDAD EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Introducción

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del Sistema Nervioso Central (SNC) que produce inflamación, desmielinización y daño axonal y supone la primera causa de discapacidad en adultos jóvenes en países occidentales.

En la primera fase de la enfermedad juega un papel destacado la inmunidad adaptativa. Sin embargo, la enfermedad cambia con la edad: bajan la tasa de brotes, el número de lesiones activas en la sustancia blanca y el número de linfocitos en el SNC; mientras que, paradójicamente aumenta la discapacidad de los pacientes. Además, disminuye la eficacia de los tratamientos actuales, centrados principalmente en frenar la inmunidad adaptativa, y aumenta el riesgo de efectos secundarios graves asociados a estas terapias.

Datos preliminares sugieren que el aumento de la edad podría relacionarse en la EM con la activación de la respuesta inmune innata y el descenso de la respuesta inmune adaptativa. No obstante, este proceso y los factores inmunológicos implicados en él se ignoran aún en su mayoría. Además, la EM es una enfermedad heterogénea y también se desconoce si la presencia de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE), que se asocian con una EM altamente inflamatoria, podrían influenciar los cambios relacionados con la edad que experimentan estos pacientes.

Objetivos

- Analizar los cambios relacionados con la edad en la respuesta inmunitaria del líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre periférica de los pacientes con EM.
- Evaluar si existe una edad a la cual estos cambios se ponen claramente de manifiesto
- Estudiar la posible influencia del perfil inmunológico previo en dichos cambios.
- Analizar la relación entre los cambios inmunológicos asociados a la edad y la respuesta clínica de los pacientes.

Materiales y métodos

Analizamos los datos clínicos e inmunológicos de 264 pacientes con EM. Examinamos la presencia de bandas oligoclonales de IgG (BOCG) y BOCM-LE mediante isoelectroenfoque e inmunodetección en LCR y suero. Analizamos las diferentes poblaciones leucocitarias del LCR y la sangre periférica mediante citometría de flujo. Estudiamos la producción intracelular de citoquinas por linfocitos y monocitos de LCR mediante cultivos celulares y citometría de flujo. Cuantificamos por ELISA distintos factores solubles asociados con la respuesta inmune y la cadena ligera de los neurofilamentos (NF-L) en LCR y los niveles de IgG anti-CMV (Citomegalovirus) en suero. Evaluamos la relación de estas variables con la edad mediante correlación de Spearman.

Resultados

Los pacientes con EM mostraron una disminución del número de linfocitos y células NK y un incremento relativo de monocitos. Estos cambios se hacían evidentes a

partir de la edad de 45 años. Observamos que el descenso en el número de linfocitos y células NK de LCR únicamente se producía en los pacientes BOCM-LE-. Este descenso se observaba en los linfocitos T CD4, sus diferentes subpoblaciones (naïve; memoria central, MC; memoria efectora, ME; terminalmente diferenciadas, TD; y reguladoras) y las células CD4 productoras de citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17, GM-CSF). El número general de linfocitos T CD8 también descendía en el grupo BOCM-LE-, a la vez que disminuía el número de sus diferentes subpoblaciones, con la excepción de las células T de memoria residente (TMR). Además, disminuyó el número de células CD8 productoras de IFN- γ , TNF- α y GM-CSF únicamente en los pacientes BOCM-LE-. Los linfocitos B bajaron tanto en número como en porcentaje en el grupo BOCM-LE-, lo que se acompañó de una caída muy acusada de la población B naïve, si bien disminuyeron también los plasmablastos y las células B de memoria. Sin embargo, el número de células B productoras de TNF- α disminuyó tanto en el grupo BOCM-LE-, como en el BOCM-LE+. A su vez, aumentó el porcentaje de monocitos productores de IL-1 β en los dos grupos; mientras que el de monocitos productores de TNF- α sólo se incrementó en el grupo BOCM-LE+ y el de monocitos productores de IL-6 en el grupo BOCM-LE-.

Con respecto a los factores solubles del LCR, vimos que las concentraciones de PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) y activina A se incrementaban con la edad en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, las concentraciones de *chitinase 3-like 1* (CHI3L1) y GFAP (proteína glial fibrilar ácida) sólo aumentaban en los pacientes BOCM-LE-.

Además, en la sangre periférica se observó un aumento del título de IgG anti-CMV en los pacientes BOCM-LE- con la edad, a la vez que disminuía el porcentaje de linfocitos T CD8 naïve y de plasmablastos.

Cuando estudiamos los datos clínicos, el número de lesiones que captan Gadolinio disminuía con la edad en ambos grupos de pacientes. Aunque el EDSS y el MSSS eran superiores en los pacientes BOCM-LE+, el EDSS únicamente se incrementó con la edad en los pacientes BOCM-LE-. El incremento del EDSS asociado a la edad se relacionó principalmente con el incremento de la concentración de CHI3L1 y el aumento de los monocitos productores de IL-6 en LCR. Por el contrario, los valores más altos de MSSS de los pacientes BOCM-LE+ se relacionaban fundamentalmente con el aumento del porcentaje de monocitos productores de IL-1 β y de las concentraciones de activina A y CHI3L1 en LCR.

Conclusiones

El aumento de la edad en los pacientes con EM se acompaña del descenso de la respuesta inmune adaptativa y el incremento de la respuesta innata en el SNC. Este proceso ocurre de manera precoz, puesto que ya a los 45 años se hacen patentes estos cambios y el perfil inmunológico de los pacientes influencia este proceso de inmunosenescencia precoz. Únicamente los pacientes BOCM-LE- muestran un descenso de la respuesta adaptativa. Sin embargo, en ambos grupos se produce la activación de la respuesta inmune innata, aunque con un patrón desigual. En la sangre periférica de los pacientes BOCM-LE- también se evidencian algunos cambios asociados a la inmunosenescencia precoz. El aumento de la edad en estos pacientes se relaciona con una disminución del número de lesiones que captan Gadolinio y con un

aumento del EDSS en el grupo BOCM-LE-. Por otra parte, los pacientes BOCM-LE+ tienen el EDSS y MSSS más elevados, independientemente de la edad, y ambos fenómenos se relacionan con un patrón diferencial de activación de la respuesta inmune innata.

IMMUNOLOGICAL MECHANISMS RELATED TO THE PROGRESSION ASSOCIATED WITH AGE IN MULTIPLE SCLEROSIS

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease affecting the Central Nervous System (CNS) characterized by inflammation, demyelination and axonal damage, and it is the major cause of disability in young adults in the western countries.

In the first phase, the adaptive immunity plays an important role in MS. Aging associates with a reduction of the relapse rate, the number of active lesions in the white matter, and the number of infiltrating lymphocytes within the CNS; although paradoxically patient disability increases. In addition, it is related to a decrease in the efficacy of the current treatments, which are mainly focused on adaptive immunity; and with a greater risk of suffering serious side effects associated with these therapies. Preliminary data suggested that in MS patients aging and immunosenescence could be related to the activation of the innate immune response and the decrease in the adaptive one. However, this has not been fully demonstrated and the immunological factors involved in these changes remain unknown. Moreover, MS is a heterogeneous disease. The presence of lipid-specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMB) associates with a highly inflammatory disease course, but its relation with age-associated changes has not been explored yet.

Objectives

- To analyse the age-related changes occurring in the cerebrospinal fluid (CSF) and the peripheral blood immune responses of MS patients.

- To evaluate if there is an age at which these changes are clearly demonstrated.
- To study the possible influence of the previous immunological profile.
- To analyse the relationship between the age-related immunological changes and the clinical data in MS patients.

Material and methods

Clinical and immunological data of 264 patients diagnosed with MS were studied. We analysed the presence of oligoclonal IgG bands (OCGB), and of LS-OCMB in CSF and serum by isoelectric focusing and immunodetection. We studied the different leukocyte populations of CSF and peripheral blood by flow cytometry. To study the intracellular production of cytokines by lymphocytes and monocytes of the CSF, we performed cell cultures and analysed them by flow cytometry. We quantified by ELISA the following molecules in the CSF: NF-L (neurofilament light chain), PD-L1 (ligand 1 of programmed death), activin A, CHI3L1 (chitinase 3-like 1), and GFAP (glial fibrillary acid protein). In addition, we quantified anti-CMV IgG antibodies in serum. We evaluated the relationship of these variables with age through Spearman correlation.

Results

We observed an age related reduction in the number of CSF lymphocytes and NK cells, while monocytes increased relatively, being changes apparent from an age of 45 years.

We analysed whether the immunological profile of the patients, classified according to LS-OCMB, influenced this process and observed that the decline in lymphocytes and NK cells only occurred in LS-OCMB- patients. When studying the

different lymphocyte subsets, we observed that the total number of CD4 T lymphocytes diminished in LS-OCMB- patients, as well as the number of their subpopulations (naïve, central memory, CM, effector memory, EM, terminally differentiated, TD, and regulatory) and the number of CD4 cells producing cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-17, GM-CSF). In LS-OCMB-, the total number of CD8 T lymphocytes and the number of their different subpopulations also decreased, with the exception of resident memory T cells (TMR). In addition, the number of CD8 cells producing IFN- γ , TNF- α and GM-CSF only diminished in LS-OCMB-. The B lymphocytes decreased both in number and percentage in LS-OCMB-, being the sharper decline found in the naïve B population, although plasmablasts and memory B cells also diminished. In addition, the number of B cells producing TNF- α decreased in both LS-OCMB+ and LS-OCMB-. On the other hand, the percentage of monocytes producing IL-1 β increased in the two groups; with additional selective increases in the percentages of monocytes producing TNF- α or IL-6 in LS-OCMB+ and LS-OCMB-, respectively.

When explored CSF soluble factors, we observed that the concentrations of PD-L1 and activin A increased with age in both groups. However, the concentrations of CHI3L1 and GFAP only augmented in LS-OCMB-.

In addition, anti-CMV IgG antibody titers increased in the peripheral blood of LS-OCMB- patients, while the percentages of naïve CD8 T lymphocytes and plasmablasts decreased in the same patients with aging.

Finally we explored the clinical variables. The number of Gadolinium enhancing lesions decreased with age in both groups. On the other hand, LS-OCMB+ patients showed higher EDSS and MSSS scores independently of age. Although EDSS increased

with age in LS-OCMB-, we did not find an increase in the MSSS score in these patients. The age-associated increase in the EDSS was mainly related to a CSF rise in the CHI3L1 concentration and in IL-6 producing monocytes. By contrast, the higher MSSS values observed in LS-OCMB+ patients was mainly related to an increase in the percentage of monocytes producing IL-1 β and to the concentrations of activin A and CHI3L1 in CSF.

Conclusions

Aging is accompanied in MS patients by a decrease in adaptive immune response and an increase in innate immune response in the CNS. This process occurs at an early stage, since these age-related changes become apparent at the age of 45. The immunological profile of the patients influences this process of immunosenescence, since only LS-OCMB- patients experience a generalized decrease in adaptive immune response. However, an activation of the innate immune response occurred in both groups of patients, although with a distinct pattern. Some changes associated with early immunosenescence were also detected in the peripheral blood of LS-OCMB- patients. Aging also correlated with a decrease in the number of Gadolinium enhancing lesions and an increase in the EDSS in LS-OCMB- patients. By contrast, LS-OCMB+ ones show higher EDSS and MSSS independently of age. The different patterns of changes in the disability scores are related to differential profiles of activation of the innate immune response.

1. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC), que cursa con inflamación, desmielinización y daño axonal. Supone la principal causa de discapacidad no traumática en los adultos jóvenes de los países desarrollados (1) y como la mayoría de las enfermedades autoinmunes, afecta principalmente a las mujeres con un ratio mujer:hombre 3:1 (2). Se calcula que en el mundo la padecen unos 2,5 millones de personas (3), y a pesar de la aparición de tratamientos que modifican el curso de la enfermedad, su manejo continúa siendo un desafío, dado el carácter heterogéneo de esta enfermedad.

La edad más frecuente de inicio se sitúa en torno a los 30 años (2). En ese momento, los pacientes suelen manifestar la forma clínica más frecuente, es decir la forma remitente-recurrente (EMRR). Esta se caracteriza por brotes clínicos de disfunción neurológica, seguidos por períodos clínicos de remisión (4). Tras 15 a 20 años, un porcentaje elevado de pacientes con EMRR desarrolla la forma secundariamente progresiva (EMSP), definida por el aumento de la discapacidad neurológica, independientemente de la presencia de brotes (4). A su vez, alrededor del 10% de los pacientes manifiesta la forma clínica primariamente progresiva (EMPP), caracterizada por la progresión de la discapacidad neurológica desde el comienzo de la enfermedad (4).

La etiología de la EM sigue siendo desconocida, aunque se ha postulado que se originaría por la interacción entre factores genéticos y ambientales (5). Los pacientes pueden mostrar distintos síntomas clínicos como déficit sensorial, alteraciones visuales o disfunción motora (5). Cada uno de estos síntomas se asocia con la aparición de

lesiones desmielinizantes en diferentes localizaciones del SNC. Además, la EM es una enfermedad heterogénea en la cual los pacientes muestran distinta evolución en cuanto a la progresión de la discapacidad y a la gravedad y frecuencia de los brotes clínicos (5). Por último, el curso de la enfermedad cambia a medida que aumenta la edad de los pacientes, lo que podría reflejar un proceso de inmunosenescencia precoz.

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Robert Carswell y Jean Cruveilhier describieron por vez primera en 1838 y 1841, respectivamente, las lesiones desmielinizantes, como áreas descoloridas en la protuberancia y la médula espinal (6,7). Sin embargo, no fue hasta casi 30 años después cuando Jean-Martin Charcot llevó a cabo la primera descripción clínica y anatómica de un paciente vivo con EM (8).

Con respecto a la etiología, dos hechos merecen especial mención. En primer lugar, en 1884 Pierre Marie señaló que la posible causa de la enfermedad podría ser infecciosa, puesto que observó que los pacientes empeoraban tras sufrir períodos infecciosos o febriles (9). Sin embargo, en 1935 Thomas River apuntó el posible origen autoinmune de la enfermedad, ya que consiguió desarrollar un modelo experimental de esta, encefalitis autoinmune experimental (EAE), inoculando tejido neural en animales de experimentación (10).

En 1891, el médico alemán Heinrich Irenaeus Quincke introdujo la punción lumbar con fines diagnósticos y terapéuticos (11), lo que permitió el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR). Posteriormente, en 1942, Kabat *et al* describieron, mediante el

uso de la electroforesis, que en el LCR de los pacientes con EM se incrementaba la concentración de inmunoglobulina G (IgG) (12), lo que supuso la primera prueba de la importancia del sistema inmune en la patogenia de esta enfermedad.

Con respecto al ámbito clínico hay que destacar el año 1955, cuando John F. Kurtzke desarrolló la primera escala que permitía medir el grado de discapacidad física de los pacientes, la *Disability Status Scale* (DSS) (13). Esta se amplió en 1983 originando la *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (14), la cual se utiliza en la actualidad. Así mismo, merece atención el año 1965, puesto que Schumacher G. *et al* publicaron los primeros criterios diagnósticos de la EM (15). Por último, la introducción de la Resonancia Magnética (RM) supuso un gran avance en el entendimiento y manejo de la EM, ya que permitió detectar las lesiones desmielinizantes en el propio SNC del paciente (16).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Se calcula que la prevalencia de la EM se sitúa entre 50 y 300 casos por cada 100.000 habitantes (5); pero esta cifra no es uniforme, ya que, aunque con excepciones, la prevalencia aumenta según nos alejamos del Ecuador (3). De este modo, la mayor prevalencia la encontramos en Europa, América del Norte, Nueva Zelanda y Australia (3). Esto podría indicar que hay factores ambientales que influyen en el riesgo de padecer EM, aunque parece que estos juegan principalmente un papel en la infancia. Así, los estudios migracionales han demostrado que los niños que emigran a una zona con una prevalencia distinta a la de su lugar de origen adoptan la

prevalencia de su lugar de destino. Sin embargo, cuando la migración se produce en la edad adulta, se mantiene la prevalencia del lugar de origen (1,5).

La incidencia de la enfermedad está aumentando y de manera especial en el caso de las mujeres, por lo que los estudios sitúan el ratio mujer: hombre en torno a 3:1 en la mayoría de los países desarrollados (1).

En España los primeros estudios realizados situaron la prevalencia de la enfermedad en torno a los 6,5 casos por cada 100.000 habitantes (17). Sin embargo, los últimos trabajos describen que la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado y se encuentra entre 71,9 y 125 casos por cada 100.000 habitantes, dependiendo de las zonas estudiadas (17).

1.3 ETIOLOGÍA

Se postula que la EM tiene su origen en la interacción entre diversos factores genéticos y ambientales (18). A continuación se detallan aquellos que se han relacionado de forma más clara con la enfermedad.

1.3.1 Factores genéticos

La idea de que los factores genéticos podrían contribuir al desarrollo de la EM se fundamentó en dos tipos de estudios: los estudios familiares y los estudios de concordancia entre gemelos monoigóticos. En primer lugar, los estudios familiares revelan que el riesgo de padecer la enfermedad es mayor en los familiares de un paciente con EM con respecto a la población general (19,20) y uno de cada ocho pacientes con EM tiene antecedentes familiares (20). Por otro lado, se ha visto que los

gemelos monozigóticos presentan una concordancia que va desde 14,5 % hasta 24% según las cohortes analizadas, mientras que esta se reduce hasta el 3-4% en gemelos dizigóticos (21,22). Estos datos apuntan hacia la existencia de factores genéticos asociados a la EM, aunque también indican que estos no son los únicos responsables del desarrollo de la enfermedad. Así, se dice que la EM es una enfermedad que se asocia con múltiples genes de forma modesta, los cuales determinan parcialmente el riesgo de padecer la enfermedad.

Como en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, la región que codifica el complejo principal de histocompatibilidad o antígeno leucocitario humano (HLA) se ha relacionado con el riesgo de padecer EM. En concreto, los individuos portadores del alelo HLA DRB1*15:01 presentan tres veces más riesgo de padecer EM que los individuos no portadores (23). Así mismo, los estudios GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) han puesto de manifiesto que polimorfismos en otros genes relacionados con la respuesta inmune pueden influir en el riesgo de sufrir EM. Algunos de estos polimorfismos se encuentran en los genes de receptores de citoquinas, como los receptores de interleuquina (IL) -7, IL-2 y TNF- α (factor de necrosis tumoral α) (24–26). Además, se han asociado con el riesgo de padecer EM variantes genéticas del factor activador de células B (BAFF) (27) y de CYP2R1, una proteína implicada en la hidroxilación de la vitamina D (28). Sin embargo, la *Odds Ratio* (OR) asociada a estos polimorfismos es baja, puesto que ronda el 1,1-1,2, en comparación con el 3,5 asociado al HLA DRB1*15:01 (29), lo que sugiere que el riesgo de padecer EM se asocia de forma modesta con distintos factores genéticos.

1.3.2 Factores ambientales y de estilo de vida

El bajo riesgo que confieren los distintos factores genéticos y la elevada discordancia observada entre hermanos gemelos monozigóticos apuntan hacia la existencia de diversos factores ambientales que favorecerían la aparición de la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos. Entre los factores analizados destacan las infecciones, los cambios en la Microbiota, la exposición solar, los niveles de vitamina D, el tabaco, la obesidad o el exceso de ingesta de sal (30).

Diversos agentes infecciosos se han relacionado con la EM, entre los que destaca el virus de Epstein-Barr (EBV). Varios estudios han demostrado que los individuos que han sufrido mononucleosis infecciosa presentan hasta dos veces más riesgo de padecer EM (31). Además, el 100% de los pacientes tienen anticuerpos frente al antígeno nuclear 1 del EBV (EBNA1); aunque el 90 % de los individuos sanos también presentan dichos anticuerpos (32). Así mismo, los pacientes con EM tienen niveles más altos de EBNA1 (33,34) y estos niveles correlacionan de forma positiva con el riesgo de padecer la enfermedad (35). Otros virus como el Herpes 6 (HHV-6) o los retrovirus endógenos humanos (HERVs) también se han asociado con el riesgo de padecer EM. En varios estudios se describe la presencia del DNA del HHV-6 en el LCR y el suero de los pacientes (36–39) y además, la detección de dicho ácido nucleico aumenta el riesgo de padecer EM (39). Se ha descrito a su vez la existencia de anticuerpos dirigidos frente a diversos componentes de este virus, tanto en LCR como en suero de pacientes (40,41) e incluso, los títulos de dichos anticuerpos se han relacionado con la aparición de brotes clínicos (41). Por otro lado, ciertos polimorfismos de HERVs se asocian con un mayor riesgo de padecer EM (42) y podrían contribuir a explicar la mayor prevalencia

de la enfermedad en las mujeres, ya que el aumento del número de copias de estos en el cromosoma X se ha relacionado con un incremento del riesgo de padecer EM (43).

En los últimos años ha crecido el interés por la Microbiota, puesto que esta se ha relacionado con diversas patologías autoinmunes (44). En el caso de la EM, hay dos estudios que han marcado un antes y un después en este campo. En primer lugar, se detectaron diferencias en la composición de la Microbiota en gemelos monozigóticos según presentaran o no la enfermedad. Especialmente se observó un incremento de *Akkermansia spp.* en el gemelo enfermo. Cuando la Microbiota intestinal del hermano con EM se trasplantó en ratones modelos de enfermedades autoinmunes cerebrales, estos aumentaron la incidencia de EAE espontánea, lo que no se objetivó con las heces del gemelo no afecto (45). Otro grupo observó un incremento de *Akkermansia muciniphila* y una disminución de *Parabacteroides distasonis* en la Microbiota intestinal de pacientes con EM con respecto a individuos sanos. Además, este grupo describió que la primera especie favorecía la aparición de un fenotipo proinflamatorio en las células mononucleares humanas, mientras que la segunda promovía un fenotipo antiinflamatorio (46). Otros grupos han descrito que los metabolitos microbianos pueden a su vez regular la actividad de células residentes en el SNC, como la microglía o los astrocitos (47,48). Sin embargo, este es un campo nuevo en el cual quedan diversas preguntas sin resolver.

El gradiente de prevalencia de la EM relacionado con la latitud pone de manifiesto que la exposición solar podría tener un papel en el desarrollo de la enfermedad (49). En este sentido, la vitamina D necesita que los rayos ultravioleta (UV) entren en contacto con la piel para poder sintetizar su forma activa. Se ha visto

que los niveles de vitamina D en suero correlacionan de forma inversa con el riesgo de padecer EM y que los pacientes suelen tener niveles bajos de esta (49). Por otro lado, la síntesis de melatonina está regulada por las variaciones en la exposición solar ocasionadas durante el ciclo día-noche y los cambios estacionales. Se ha postulado que estos últimos podrían ser corresponsables del efecto estacional observado en los pacientes con EM, ya que los niveles de melatonina correlacionan de forma inversa con la actividad de la enfermedad (50). De este modo, tanto la vitamina D como la melatonina supondrían un apoyo bioquímico al papel de la exposición solar como posible factor protector de la enfermedad.

En los últimos años ha crecido la incidencia de la EM en las mujeres; por lo que se ha sugerido que esto podría ir de la mano del incremento del número de mujeres fumadoras (51). Además, varios estudios demuestran que fumar cigarrillos aumenta el riesgo de padecer EM (52). Sin embargo, no está claro si este incremento se debe al tabaco *per se* o a la inflamación del pulmón ocasionada al fumar cigarrillos. En este sentido, el estudio de cohortes de individuos suecos, quienes prefieren el tabaco oral, ha desvelado que la nicotina se asocia con un menor riesgo de sufrir EM (53,54). Esto sugiere que sería la inflamación pulmonar originada al fumar cigarrillos la que incrementaría el riesgo de padecer EM.

Otro de los factores relacionados con la EM es la obesidad. Se ha visto que los individuos que han sido obesos durante la adolescencia presentan un mayor riesgo de padecer EM durante la edad adulta; mientras que ser obeso durante dicha etapa adulta no modifica el riesgo de EM, ni tampoco serlo en la etapa infantil (55–58). Estos datos sugieren que la adolescencia es una ventana de tiempo en la cual este factor

puede modificar el riesgo de la enfermedad. Aunque no están claras las posibles vías involucradas en este aumento de riesgo en relación con la obesidad, se ha propuesto que la inflamación asociada a esta condición, el aumento de los niveles de leptina y la disminución de la biodisponibilidad de la vitamina D podrían jugar un papel en la modificación del riesgo de padecer EM (30).

Estudios en el modelo de la EAE revelaron que concentraciones elevadas de sal favorecían la diferenciación de los linfocitos hacia T *helper* 17 (Th17) y que los animales que ingerían una dieta rica en sal mostraban un curso más grave de la enfermedad (59,60). Sin embargo, las concentraciones de sal empleadas en estos estudios fueron muy superiores a las correspondientes en la dieta humana. No obstante, se ha visto que en los pacientes con EM que ingieren una dieta rica en sal aumentan el número de brotes y las lesiones en RM (61).

1.3.3 Epigenética

Las modificaciones epigenéticas constituyen los mecanismos capaces de organizar los cambios en la expresión génica en respuesta, entre otros, a los factores ambientales. Entre las modificaciones epigenéticas relacionadas con la EM se encuentran los microRNAs (miRNAs), la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Los miRNAs son RNAs no codificantes que regulan la expresión génica mediante la degradación del RNA mensajero (mRNA) o mediante la inhibición de la traducción proteica (62). Un tercio de los genes humanos está regulado de forma negativa por los miRNAs y estos participan en un gran número de procesos biológicos (63). Se ha visto que los pacientes con EM expresan un patrón específico de miRNAs tanto en LCR como

en sangre, permitiendo diferenciar a los pacientes de los individuos sanos (64,65). Además, su expresión también se modifica con los tratamientos inmunomoduladores de la EM (66), por lo que podrían consolidarse como biomarcadores de respuesta a dichas terapias.

La metilación del DNA consiste en unir grupos metilo a las Citosinas presentes en las regiones CpG gracias a la acción de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT1-3). Estas regiones se encuentran habitualmente próximas a las regiones promotoras de los genes o incluso forman parte de ellas, por lo que sus modificaciones contribuyen a regular la expresión génica (67,68). Se ha visto que los pacientes con EM presentan un diferente patrón de metilación del DNA con respecto a los individuos sanos en varias regiones génicas (67,69,70). Así, los pacientes con EM portadores del alelo HLA DRB1*15:01 tienen hipometilada la región codificante del HLA DRB1 en los monocitos, lo que podría favorecer el aumento del riesgo observado en los portadores de este alelo (71). Por otro lado, al analizar el patrón de metilación de células residentes en el SNC, como los oligodendrocitos, se ha visto que estos tienen las regiones promotoras de genes implicados en su supervivencia hipermetiladas (69).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas se han consolidado como mecanismos epigenéticos capaces de alterar la estructura y la dinámica de la cromatina en relación a la regulación de la expresión génica (72). Varios estudios en el modelo de la EAE apuntaban hacia la implicación de estos mecanismos en la patogenia de la EM (72). Además, en la sustancia blanca de pacientes con EM se ha descrito un incremento de la acetilación de histonas situadas en las regiones de los genes implicados en la diferenciación de los oligodendrocitos, provocando una disminución

de la expresión de estos (73). Las modificaciones de las histonas también se han relacionado con cambios en las células del sistema inmune de los pacientes con EM. Así, se ha visto que en el LCR y las lesiones de los pacientes aumenta la expresión de genes implicados en la metilación de histonas (74).

1.4 FORMAS CLÍNICAS

La primera descripción de las formas clínicas de la EM se publicó en 1996 y permitió unificar la terminología empleada para definir los diferentes cursos clínicos de esta heterogénea enfermedad. Se describieron cuatro cursos clínicos: remitente-recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP), primaria progresiva (EMPP) y progresiva recurrente (EMPR) (75). Sin embargo, los autores destacaron que estas definiciones se basaron en las visiones subjetivas de los expertos y que carecían de apoyos biológicos objetivos, por lo que abrían la puerta a revisiones posteriores (75). De este modo, en 2013 se revisó la definición de las formas clínicas de la enfermedad añadiéndose el síndrome neurológico aislado (SNA), eliminando la forma EMPR e incorporando los datos de actividad, progresión y empeoramiento de la enfermedad (76).

La EM activa se definió como aquella en la que surgían nuevos episodios de disfunción neurológica en ausencia de fiebre o infección, seguidos de recuperación total o parcial, o también aquella en la que aparecían nuevas lesiones en T2 o captantes de Gadolinio (76). Por su parte, la EM progresiva se definió como aquella en la que la disfunción neurológica o la discapacidad aumentaban sin períodos de remisión (76). Por último, el empeoramiento de la enfermedad se resumió como el

incremento de la disfunción neurológica o de la discapacidad, como consecuencia de la aparición brotes clínicos, por lo que el término progresión quedó reservado únicamente para la fase progresiva de la enfermedad (76).

1.4.1 Síndrome neurológico aislado (SNA)

En la revisión de las formas clínicas de la EM se incluyó el SNA como la primera manifestación de una enfermedad desmielinizante inflamatoria compatible con EM, pero que no cumple los criterios de diseminación en el tiempo. Esta inclusión se debió a que en los estudios de historia natural de la enfermedad y en los ensayos clínicos se puso de manifiesto que los SNA con lesiones en RM tienen una alta probabilidad de terminar cumpliendo criterios de EM (76). En este sentido, los SNA se pueden clasificar como no activos o activos, dependiendo de si tienen nuevos brotes clínicos y/o lesiones en RM. En este último caso, los pacientes se clasificarían dentro de la forma EMRR si cumplen los criterios diagnósticos.

1.4.2 Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (EMRR)

La EMRR se definió ya en la primera descripción de las formas clínicas como aquella en la que aparecen brotes clínicos claramente definidos con recuperación total o parcial, acompañados de períodos de remisión entre los brotes (75). Esta es la forma más común de la enfermedad, ya que afecta al 85% de los pacientes con EM. Suele aparecer en torno a los 30 años y se puede clasificar en forma activa o no activa (76).

1.4.3 Esclerosis Múltiple Progresiva

La EM progresiva agrupa en la nueva descripción a dos formas clínicas definidas ya en 1996: la EMPP y la EMSP. La EMPP se reconoció como una entidad clínica en la

cual los pacientes mostraban progresión de la enfermedad desde el comienzo de esta de forma independiente a la aparición de los brotes clínicos (75). Por su parte, la EMSP se definió como una forma clínica que inicia como EMRR, pero que alcanza una fase de progresión de la discapacidad con o sin brotes sobreañadidos (75).

Además, en la descripción de 2013 se clasificó a las formas progresivas en función de la actividad y la progresión en cuatro categorías: activa y con progresión, activa pero sin progresión, inactiva pero con progresión e inactiva sin progresión (76).

1.5 DIAGNÓSTICO

La EM no posee ninguna prueba patognomónica para su diagnóstico, por lo que a lo largo de los años se han propuesto diversos criterios diagnósticos con el fin de unificar y adelantar su diagnóstico. Los primeros criterios que permitieron definir clínicamente la EM se publicaron en 1965 por el grupo encabezado por el doctor George Schumacher (15). Estos consideraban fundamentales para el diagnóstico de la EM los siguientes puntos: signos objetivos de disfunción del SNC, presencia de lesiones en dos o más zonas, afectación predominante de la sustancia blanca, dos o más episodios de al menos 24 horas de duración y separados por al menos un mes o progresión lenta de más de 6 meses de duración, edad de comienzo entre los 10 y los 50 años y diagnóstico por un neurólogo experto que considerara que los signos y síntomas no eran explicables por otra causa (15). A estos criterios le siguieron los liderados por el doctor Douglas McAlpine que dividieron a la EM en tres: EM probable latente, EM probable y EM posible (77). En 1983 Charles Poser *et al* publicaron unos criterios diagnósticos ampliamente reconocidos que dividieron a la EM en varias

categorías según el cuadro clínico y/o los resultados del laboratorio: EM clínicamente definida, EM clínicamente definida con apoyo de laboratorio, EM probable y EM probable con ayuda de laboratorio (78).

Finalmente, en el año 2000 el profesor Ian McDonald encabezó el grupo de expertos que definió los criterios de McDonald que incorporaron la RM al diagnóstico de la enfermedad y minimizaron el valor de las bandas oligoclonales de IgG (BOCG) en el mismo (79). Estos se han revisado en dos ocasiones: 2010 (80) y 2017 (81). En la primera de ellas se diferenció entre la EM y los trastornos del espectro de la neuromielitis óptica (NMOSD) (80). La revisión de 2017 es la que se utiliza en la actualidad y volvió a introducir el estudio del LCR en los criterios diagnósticos. Así, tras un SNA la presencia de diseminación en espacio y BOCG permite el diagnóstico precoz de EM (81). No obstante, esta última revisión apunta hacia la necesidad de una mayor investigación en diversos ámbitos que permita precisar aún más el diagnóstico de la EM (81).

1.5.1 Resonancia Magnética (RM)

La sensibilidad de la RM en la detección de las lesiones es cercana al 95% y el patrón típico de lesiones en áreas características de la EM puede contribuir a adelantar el diagnóstico de la enfermedad; pero hay que tener en cuenta que otras patologías pueden originar lesiones que podrían confundirse con las de la EM, como son aquellas que aparecen en mujeres de mediana edad que padecen migraña o las causadas por isquemia, edema, inflamación o desmielinización.

La RM contribuye a demostrar la diseminación en tiempo y en espacio, fundamentales en los criterios de McDonald (79–81). La diseminación en espacio

puede demostrarse por la presencia de una o más lesiones en T2 en al menos dos de las cuatro regiones características de la EM: yuxtacortical, periventricular, infratentorial y medular (80). Por su parte, la diseminación en tiempo puede justificarse si aparece una nueva lesión en T2 y/o una lesión que capta Gadolinio, en comparación con una RM previa, o si aparecen de forma simultánea lesiones captantes y no captantes (80). Como hemos visto, en la última revisión de los criterios de McDonald esta condición puede sustituirse por la presencia de BOCG en el LCR (81). Por último, la RM permite valorar la actividad de la enfermedad, la evolución clínica y la respuesta al tratamiento.

1.5.2 Potenciales evocados

Los potenciales evocados constituyen una prueba neurofisiológica en la cual se evalúa la conductividad de los impulsos eléctricos en el SNC tras estimular un órgano sensitivo o sensorial periférico (82). Cuando circulan a través de fibras desmielinizadas, estas señales se bloquean o retardan, de forma que los potenciales evocados pueden encontrarse atenuados, ausentes o retrasados (82).

1.5.3 Estudio del LCR en el diagnóstico

Una de las características de la EM es la síntesis intratecal de IgG que aparece en alrededor del 96% de los pacientes con esta patología. La síntesis intratecal de IgG puede medirse, ya sea mediante métodos cualitativos o semicuantitativos, siendo los primeros los más sensibles. Los métodos semicuantitativos se basan en la determinación de una serie de índices como los de Tourtellote (83), de Reiber (84) y de IgG o Tibbling (85). En todos ellos se introduce la función de la barrera hematoencefálica (BHE) al incluir en la fórmula el cociente de albúmina LCR/ albúmina

suero. De este modo, si aumenta la IgG del LCR por difusión desde la sangre también lo hará la albúmina, ya que esta sólo se sintetiza en el hígado y funciona como un indicador de la integridad de la BHE. Por el contrario, si la IgG del LCR aumenta debido a la síntesis intratecal, la albúmina del LCR no se incrementará y los índices se situarán fuera de sus valores de normalidad.

Los métodos cualitativos son más sensibles que los cuantitativos y se basan en la demostración de la presencia de BOCG en el LCR no presentes en muestras pareadas de suero. Estas aparecen en más del 96% de los pacientes con EM, aunque no son patognomónicas, ya que pueden evidenciarse en otras patologías, como las infecciones del SNC (86).

1.6 NEUROPATOLOGÍA

La principal característica de la EM es la presencia de lesiones desmielinizantes en la sustancia blanca, aunque en los últimos años se ha demostrado también la presencia de lesiones corticales (87). La desmielinización se acompaña a la larga de la destrucción y pérdida de los oligodendrocitos, aunque los axones neuronales pueden preservarse, al menos en parte (88). Las lesiones desmielinizantes se caracterizan por la infiltración de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados (88). En las etapas iniciales, la desmielinización comienza en las zonas perivenulares y en las lesiones inactivas, la desmielinización se asocia a su vez con la activación de los astrocitos y la formación de la cicatriz astrocitaria (88). Además, las lesiones pueden incluso mostrar signos de remielinización, ya que pueden reclutar y diferenciar progenitores de oligodendrocitos (89).

1.6.1 Lesiones focales de la sustancia blanca

En la EM la inflamación se asocia por tanto, con la formación de distintas lesiones focales en la sustancia blanca del cerebro y la médula espinal (90). Estas incluyen: las clásicas lesiones activas acompañadas de un gran daño de BHE, las lesiones crónicas activas o lesiones que se expanden lentamente con un bajo nivel de desmielinización en el borde y poco daño de BHE, lesiones inactivas y placas en sombra remielinizadas (91,92). Durante la evolución de la enfermedad, se producen cambios en el patrón lesional. De este modo, las lesiones focales activas son más abundantes en los pacientes en fases iniciales; mientras que su número disminuye en los pacientes que alcanzan la fase progresiva (90).

1.6.2 Desmielinización en la sustancia gris

En los últimos años el estudio de las lesiones de la sustancia gris ha cobrado gran importancia en la EM (90). Aunque las lesiones de la sustancia gris se incrementan en número y tamaño al aumentar la duración de la enfermedad, también se han detectado en las fases iniciales (93,94). Se ha observado que la presencia de folículos linfoides leptomeníngeos y el grado de inflamación meníngea se asocian con la aparición de lesiones corticales subpiales, cuyo número correlaciona con una mayor neurodegeneración y con una evolución agresiva de la enfermedad (95,96). Mientras que las células plasmáticas permanecen en las meninges, la desmielinización cortical tiene lugar en la sustancia gris y se asocia con la activación de la microglía en los lugares de destrucción activa de la mielina (97). La desmielinización cortical se acompaña a su vez de una gran degeneración axonal que sigue un gradiente desde la superficie de las meninges hasta la corteza profunda (97).

1.6.3 Lesiones difusas en las sustancias blanca y gris aparentemente normales

Las lesiones difusas de las sustancias blanca y gris aparentemente normales son frecuentes en el SNC de los pacientes con EM, especialmente en los pacientes con formas progresivas (90). Estas presentan pequeños infiltrados inflamatorios perivasculares, acompañados de alguna infiltración difusa del tejido, especialmente de linfocitos T CD8, daño axonal difuso con desmielinización secundaria, cicatriz astrocitaria y activación de la microglía (90). En ellas se produce pérdida axonal asociada a la inflamación (97). Además, en estas zonas también se puede evidenciar neurodegeneración asociada a la edad debida entre otros fenómenos al estrés oxidativo y a la hipoxia ocasionada por el daño mitocondrial (98). El estudio de estos procesos es un tema candente en la investigación actual en la EM, ya que podría desvelar las causas de los cambios clínicos asociados a la edad.

1.7 FISIOPATOLOGÍA

La EM se considera una enfermedad autoinmune de origen multifactorial cuya fisiopatología implica a numerosos tipos celulares y que además evoluciona a lo largo del tiempo (2). Se postula que linfocitos T autorreactivos desencadenarían la respuesta inmune patológica, ya que podrían activarse mediante fenómenos de mimetismo molecular (a través de epítomos compartidos entre la mielina y los microorganismos u otros factores) o superantígenos procedentes de agentes infecciosos. De este modo, los linfocitos T autorreactivos se activarían en los órganos linfoides periféricos tras interactuar con las células presentadoras de antígeno (CPA): células dendríticas, monocitos-macrófagos y linfocitos B (5). Seguidamente, dichos linfocitos T

autorreactivos activarían a otras células del sistema inmune, como los linfocitos B, los monocitos y los linfocitos T CD8. Todos ellos expresarían distintas moléculas de adhesión que les permitirían migrar hacia el SNC y atravesar la BHE. Una vez en el SNC, estas células serían expuestas nuevamente al antígeno, se reactivarían y comenzarían la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas como el IFN- γ (interferón γ), TNF- α e IL-17. Dichas citoquinas promoverían la activación de monocitos y células de la microglía, las cuales favorecerían el reclutamiento hacia el SNC desde la periferia de más células del sistema inmune. Estas mediarían el daño de los oligodendrocitos y las neuronas mediante diversos procesos como: la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (linfocitos T CD8), la activación del complemento (tras la unión a las inmunoglobulinas) o la liberación de mediadores neurotóxicos. Además, como resultado del daño celular, se liberarían nuevos antígenos que favorecerían la diseminación de epítomos y el incremento de dianas antigénicas para los linfocitos T (99).

1.7.1 Linfocitos T CD4

Dos hechos centraron inicialmente las investigaciones acerca de la EM en los linfocitos T CD4: la presencia de linfocitos T CD4 en las lesiones desmielinizantes desde el inicio de la enfermedad y la asociación con el alelo HLA DRB1*15:01 (2). Además, esto se vio favorecido por la demostración de que la transferencia de linfocitos T CD4 que reconocían la proteína básica de la mielina era suficiente para inducir la enfermedad en el modelo de la EAE (100).

Los linfocitos T CD4 pueden subdividirse en función de la expresión del receptor de quimiocinas C-C tipo 7 (CCR7) y CD45RO en linfocitos naïve, de memoria central

(MC), memoria efectora (ME) y terminalmente diferenciados (TD). En los individuos sanos se ha descrito el predominio de la población de MC en el LCR (101). Sin embargo, en los individuos con EM aumenta la población efectora, compuesta por los linfocitos ME y TD (102). Además, en el caso de los linfocitos T CD4 es importante distinguir entre sus diferentes subpoblaciones efectoras: Th1, Th2, Th17 y T reguladores. Se ha descrito que en la EM las principales poblaciones involucradas en la enfermedad son los linfocitos Th1 y Th17 (103). Los linfocitos Th1 se diferencian gracias a la acción de la IL-12, la cual favorece la expresión del factor de transcripción T-bet (*T-box transcription factor*). Además, esta subpoblación se caracteriza por secretar citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α . Por su parte, los linfocitos Th17 se diferencian gracias a las citoquinas IL-6, IL-1 β , IL-23 y TGF- β (Factor de crecimiento transformante β). Estas promueven la expresión de los factores de transcripción ROR γ t (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor- γ t*) y STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), los cuales favorecen la expresión y secreción de IL-17 e IL-22, las citoquinas más características de esta subpoblación. Además, en los últimos años ha aumentado el interés por el GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), ya que se ha visto que en el modelo animal la secreción de esta citoquina por parte de los linfocitos T CD4 es necesaria y suficiente para inducir la EAE (104).

Los linfocitos T reguladores constituyen una subpoblación de linfocitos T CD4 cuyas funciones consisten en suprimir la respuesta inmunitaria y mantener la tolerancia frente a lo propio. Esta subpoblación se caracteriza por la expresión del factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead box Protein 3*) y la secreción de IL-10. En diversas enfermedades autoinmunes se ha descrito que su número o funcionalidad se

encuentran disminuidos (105–107). En la EM, los estudios muestran que los pacientes tienen niveles de linfocitos T reguladores similares a los de los individuos sanos (108,109); mientras que su funcionalidad se encontraría disminuida, favoreciendo el desarrollo de la patología (109).

1.7.2 Linfocitos T CD8

Los estudios histológicos han demostrado que el número de linfocitos T CD8 presentes en las lesiones supera ampliamente al de los linfocitos T CD4 y que además dicho número correlaciona con el daño axonal (110,111). Los linfocitos T CD8 necesitan reconocer al antígeno en el contexto de las moléculas HLA de clase I, pero en condiciones normales únicamente las células de la microglía, los macrófagos y las células endoteliales del SNC expresan estas moléculas. Sin embargo, en los pacientes con EM, el ambiente inflamatorio presente en el SNC favorece la expresión de las moléculas HLA de clase I por parte de otras células como los astrocitos, los oligodendrocitos y las neuronas (112).

En los pacientes con EM se ha descrito el incremento de las células CD8 efectoras en el LCR (113), las cuales pueden migrar hacia el tejido inflamado para llevar a cabo sus funciones efectoras (114,115). La función clásica de los linfocitos T CD8 es causar la muerte de las células diana mediante la acción de las perforinas y granzimas o tras la interacción entre Fas y FasL y moléculas relacionadas. Además, los linfocitos T CD8 producen citoquinas proinflamatorias que pueden contribuir al mantenimiento de la respuesta inmunitaria como pueden ser IFN- γ , TNF- α , IL-17 y GM-CSF (116–118).

En los últimos años ha crecido el interés acerca de las células T de memoria residente (TRM). Estas células se describieron por vez primera en el año 2001 cuando

Masopust D. *et al* demostraron que 81 días después de infectar a ratones con el virus de la estomatitis vesicular por vía intravenosa, aparecían células de vida larga específicas del virus en tejidos no linfoides (119). Posteriormente, otros autores demostraron mediante experimentos de parabiosis que estas células no tenían la capacidad de recircular (120). Inmunofenotípicamente las células TRM se caracterizan por expresar CD69, carecer de CCR7, y mostrar una expresión variable de CD103 (121). Se han detectado en diversos tejidos, incluyendo al SNC, donde podrían jugar un importante papel en la defensa frente a los virus (122). Sin embargo, no está clara su posible implicación en enfermedades autoinmunes como la EM.

1.7.3 Linfocitos B

Como hemos visto, la síntesis intratecal de IgG pone de manifiesto la importancia de la respuesta humoral en la patogenia de la EM. Además, los estudios histológicos han verificado el depósito de anticuerpos y complemento en las lesiones (123,124). Por último, la eficacia demostrada por los tratamientos anti-CD20 en la EM ha conseguido ratificar la importancia del linaje B en esta patología. Sin embargo, a pesar de su eficacia, estos tratamientos no eliminan las células plasmáticas, ni inhiben la síntesis intratecal de IgG a corto plazo (125). Esto podría sugerir que la eficacia de dichas terapias radica por tanto en otras funciones ejercidas por los linfocitos B. En este sentido, los linfocitos B podrían funcionar como CPA, ya que se ha descrito que estas células pueden presentar de forma eficiente antígenos del SNC a los linfocitos T (126). A su vez, los linfocitos B producen y secretan citoquinas, tanto proinflamatorias (GM-CSF, TNF- α , IL-6), como antiinflamatorias (IL-10), contribuyendo de esta forma a regular la respuesta inmune (127).

En el LCR de los pacientes con EM se observa un enriquecimiento en las células B de memoria y de los plasmablastos (102). Estos últimos se relacionan con la producción de anticuerpos, lo que vincularía el inmunofenotipo del LCR con una de las principales características de la EM, la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Además, la respuesta humoral puede subclasificarse en respuesta T-dependiente y T-independiente. Los linfocitos B responsables de la última se caracterizan por expresar la molécula CD5 en su membrana y se han relacionado en la EM con la presencia de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE), las cuales se asocian con un peor pronóstico en la enfermedad (128).

Por otro lado, en las meninges de algunos pacientes con EM, especialmente en aquellos con la forma EMSP, se ha observado la presencia de folículos linfoides ectópicos (95–97,129). Estas estructuras se encuentran adyacentes a las zonas de lesión cortical de tipo subpial, lo que sugiere que desempeñan un papel en el desarrollo de las mismas (95). Su presencia se ha relacionado a su vez con una progresión más rápida de la enfermedad (95,96).

1.7.4 Células *Natural Killer* (NK)

Las células *Natural Killer* (NK) forman parte de la inmunidad innata y se incluyen dentro del tipo I de las células linfocíticas innatas (ILCs). Sus principales funciones consisten en causar la muerte celular de las células infectadas o tumorales, siguiendo los mismos mecanismos empleados por los linfocitos T CD8, y producir IFN- γ para activar a los macrófagos. Las células NK presentan distintos receptores activadores e inhibidores que les permiten distinguir entre las células sanas y sus células diana. Inmunofenotípicamente se caracterizan por expresar en su membrana la

molécula CD56 con distintos grados de intensidad y carecer de la expresión de CD3. Además, se pueden subclasificar según la expresión de CD56 y CD16 en las siguientes poblaciones: CD56 *dim* CD16+ y CD56 *bright* CD16-. El primer grupo constituye la población más numerosa en sangre periférica. Sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por la segunda población, la cual posee una mayor capacidad de secretar citoquinas, puesto que se ha descrito que en los pacientes con EM tratados se produce un enriquecimiento de esta población (117,130).

Por otra parte, la población NKT expresa CD56 de forma intermedia y además expresa la molécula CD3. Estas células tienen en su membrana el complejo del receptor de los linfocitos T (TCR), pero en este caso reconocen lípidos unidos a una molécula similar al HLA de clase I, denominada CD1. Sus funciones incluyen producir citoquinas capaces de estimular la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B y regular la respuesta inmune adaptativa.

1.7.5. Monocitos-macrófagos y células de la microglía

En las lesiones desmielinizantes de los pacientes con EM y en la sustancia blanca de apariencia normal se produce un incremento del número de células fagocíticas mononucleares y de su estado de activación (131,132). Las células fagocíticas del SNC incluyen las células de la microglía y los monocitos-macrófagos. Las células de la microglía se originan a partir de precursores que migran al SNC durante el desarrollo embrionario; mientras que los macrófagos derivan de monocitos procedentes de la sangre periférica, los cuales llegan al SNC siguiendo gradientes de citoquinas y quimiocinas.

Tanto las células de la microglía, como los monocitos-macrófagos pueden activar un diferente perfil transcripcional y polarizarse hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2), en función del ambiente en el cual se encuentren (133,134). Así, en un ambiente proinflamatorio, con elevados niveles de IFN- γ y otras citoquinas características de la respuesta Th1, los fagocitos mononucleares se polarizarán hacia el fenotipo M1 y producirán citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α (134). Por el contrario, en un ambiente con citoquinas antiinflamatorias e inmunorreguladoras, como las que participan en la respuesta Th2 (IL-4, IL-13), estas células se polarizarán hacia el fenotipo M2 y producirán citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- β (134), a la vez que contribuirán a la reparación del daño tisular ocasionado por la respuesta inflamatoria (134).

En el modelo animal de la EAE se han llevado a cabo experimentos enfocados en dilucidar si las células de la microglía y los monocitos-macrófagos desempeñan un papel diferente en la patogenia de la EM (135). Estos datos sugieren que al comienzo de la enfermedad, los macrófagos iniciarían el proceso de desmielinización; mientras que las células de la microglía estarían implicadas en fagocitar los restos celulares resultantes (135). Esto indicaría que las células de la microglía podrían tener un papel neuroprotector, al contribuir a resolver la inflamación, facilitar el reemplazamiento de algunas sinapsis neuronales y al contribuir a reparar el daño axonal ocasionado (136).

1.7.6. Astrocitos

Los astrocitos son las células de la glía más abundantes en el SNC. Aunque inicialmente se pensó que se trataba de células homogéneas, las nuevas técnicas

genómicas y aquellas capaces de analizar de forma individual cada célula han demostrado que existen diversas subpoblaciones con funciones diferentes (137). Algunas de estas funciones estructurales y metabólicas son: el mantenimiento de las sinapsis y la neurotransmisión, la fagocitosis y la formación de la BHE (137). De este modo, los daños ocasionados a los astrocitos en el transcurso de varias enfermedades pueden tener efectos nocivos en las funciones neuronales.

Su importancia en la EM se reconoció desde las primeras definiciones de la enfermedad, puesto que Jean-Martin Charcot identificó a los astrocitos como parte de las lesiones (8). Además, algunas moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria de la EM, como las citoquinas IL-1 β y TNF- α (138), y productos metabólicos como el ATP (139), pueden regular las funciones de los astrocitos a través de distintas vías de señalización que convergen en la activación de factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) o STATs, contribuyendo a su vez a agravar la patología de la EM. Esto sugeriría que el estudio de las diversas vías implicadas en las funciones astrocitarias podría contribuir al mayor entendimiento de la EM y a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

1.8 TRATAMIENTO

El número de fármacos aprobados para la EM ha crecido de forma substancial en los últimos 25 años. En líneas generales, los tratamientos en la EM están dirigidos a reducir la neuroinflamación, aunque también podrían tener algún efecto sobre la neurodegeneración. De este modo, los tratamientos han conseguido modificar el curso

de la enfermedad gracias a la reducción de la aparición de nuevos brotes, el empeoramiento de la discapacidad, el incremento de la atrofia cerebral y la aparición de nuevas lesiones en RM. La mayoría de estos fármacos han sido aprobados para la forma clínica EMRR; mientras que para las formas progresivas las opciones terapéuticas son limitadas (5).

Cuando hablamos acerca del tratamiento de la EM debemos distinguir entre el tratamiento de los brotes y el tratamiento modificador de la enfermedad. En el primero, se suelen emplear corticoides a dosis alta, como son la prednisona o la metilprednisolona que disminuyen la intensidad y duración de dichos brotes.

En cuanto a los tratamientos modificadores de la enfermedad, la aparición del IFN- β a comienzos de los años 90 del siglo pasado, supuso un antes y un después en el curso de la enfermedad. Aunque se desconoce su mecanismo exacto de acción, se ha visto que fomenta los mecanismos reguladores de la respuesta inmune, facilitando la polarización hacia la respuesta antiinflamatoria (140). Posteriormente, se aprobó el acetato de glatiramer, un péptido sintético compuesto por ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina, que consigue incrementar la respuesta Th2 y T reguladora en la sangre periférica de los pacientes con EM (141,142).

Posteriormente han aparecido en la EM fármacos considerados de alta eficacia, como natalizumab, alemtuzumab y ocrelizumab. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal que reconoce la integrina $\alpha 4$, la cual forma parte de la molécula VLA4 (*Very Late Antigen 4*). La unión de natalizumab y su ligando evita que los linfocitos crucen la BHE y alcancen el SNC, contribuyendo así a reducir la neuroinflamación (80,143). Alemtuzumab también es un anticuerpo monoclonal, pero en este caso

reconoce la molécula CD52, la cual se expresa en la membrana de linfocitos, monocitos y células NK. Su uso conlleva la aparición de una marcada linfopenia que tras su restauración favorece la reprogramación del sistema inmune y el establecimiento de un estado tolerogénico (144). En el año 2017, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el primer fármaco para el tratamiento de la EMPP (143). Se trata de ocrelizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce la molécula CD20, presente en la membrana plasmática de los linfocitos B. De este modo, el fármaco ocasiona la disminución del número de linfocitos B, aunque mantiene a las células plasmáticas y a los precursores de este linaje (143,145).

Merece especial mención la aparición de los fármacos orales en la EM, ya que los citados anteriormente son inyectables. El primero de ellos fue fingolimod, un análogo de la esfingosina 1-fosfato (S1P) que actúa como un antagonista de esta, impidiendo la salida de los linfocitos activados de los ganglios linfáticos y reduciendo así la población de linfocitos activados circulantes (146). Posteriormente se han aprobado nuevos fármacos orales como teriflunomida, que inhibe de forma reversible y selectiva la enzima mitocondrial dihidro-orotato deshidrogenasa, la cual participa en la síntesis *de novo* de las pirimidinas. Esta vía es fundamental para la proliferación de los linfocitos, lo que resulta en la reducción de los linfocitos T y B activados en la periferia y en el SNC de los pacientes (147). Dimetil fumarato es otro fármaco oral aprobado para el tratamiento de la EM. Se trata de un éster del ácido fumárico con propiedades inmunomoduladoras tanto en la respuesta inmune innata, como en la adaptativa (148). En 2017 la Agencia Europea del Medicamento aprobó la cladribina en su formulación oral para el tratamiento de la EMRR (143). Este análogo sintético de las purinas es fosforilado por la enzima desoxicitidina quinasa generando cladribina

trifosfato, el cual se acumula en las células interfiriendo en su metabolismo, causando daños en el DNA y favoreciendo su apoptosis (149). Debido a la elevada expresión de dicha enzima en los linfocitos, la cladribina causa una reducción mantenida de los niveles de linfocitos T y B (149).

El número de fármacos disponibles para los pacientes con EM está creciendo rápidamente, lo que supone un desafío desde el punto de vista clínico, ya que requiere de biomarcadores predictivos capaces de optimizar el cociente beneficio/riesgo de los distintos tratamientos.

Se ha descrito que con el aumento de la edad los fármacos modificadores de la enfermedad empleados actualmente en la EM ven reducida su eficacia (150), lo que sugiere la necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas para los pacientes de mayor edad. Por otro lado, la edad también contribuye a aumentar el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) (151) una infección oportunista que aparece en aproximadamente 1/250 pacientes de EM tratados con natalizumab (152,153), aunque también se ha descrito su aparición tras el uso de otros fármacos (154–156). Esto reafirma la necesidad de buscar nuevos biomarcadores y nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con EM de mayor edad.

1.9 BIOMARCADORES EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una enfermedad heterogénea, por lo que su diagnóstico y manejo clínico suponen aún hoy un desafío. Esto hace necesaria la búsqueda de biomarcadores diagnósticos, pronósticos y de respuesta a tratamiento que permitan

desarrollar una medicina personalizada en esta patología. La FDA define biomarcador como “una característica concreta medible como indicador de un proceso biológico normal o patológico o como respuesta a una exposición o intervención, incluyendo a las intervenciones terapéuticas” (157). Los biomarcadores pueden incluir características moleculares, histológicas, radiológicas o fisiológicas, pero no una apreciación de cómo se siente, funciona o sobrevive un individuo (157).

1.9.1 Bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE)

La detección de bandas oligoclonales en muestras pareadas de suero y LCR es el mejor método para demostrar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, incluyendo por tanto a la IgM. Las bandas oligoclonales de IgM (BOCM) aparecen aproximadamente en un tercio de pacientes con EM y reconocen, en alrededor de un 80% de los casos, a lípidos como la fosfatidilcolina. Se mantienen habitualmente a lo largo del curso de la enfermedad y están consideradas como un biomarcador que identifica a pacientes con formas altamente inflamatorias (158), caracterizadas por períodos más cortos entre los dos primeros brotes, la aparición de un mayor número de brotes y un aumento más rápido de la discapacidad (128). Esto se ha observado incluso en los pacientes que debutan con una neuritis óptica, que está considerado un SNA asociado a un mejor pronóstico (159).

La presencia de BOCM-LE se asocia con el establecimiento de un particular tipo de respuesta inmunológica en los pacientes con EM (160). De este modo, la detección de este biomarcador se asocia a su vez con el incremento de linfocitos B CD5+ en LCR, los cuales podrían estar implicados en la síntesis de los anticuerpos frente a lípidos (128,160). Además, la IgM es la inmunoglobulina más eficiente a la hora de activar el

complemento, lo que podría tener un importante papel en la fisiopatología de la enfermedad. Así, en los estudios en tejido se ha descrito que la IgM co-localiza junto al complemento y se sitúa en los axones y oligodendrocitos presentes en las lesiones del SNC de los pacientes con EM. (160).

1.9.2 Cadena ligera de los neurofilamentos (NF-L)

Los neurofilamentos son los principales componentes de los filamentos intermedios presentes en el citoplasma de las neuronas. Junto con los microtúbulos y los filamentos de actina, constituyen el citoesqueleto neuronal, el cual mantiene la estructura y forma neuronales y participa en el transporte axonal. Los neurofilamentos se componen de tres subunidades: cadena ligera (NF-L), cadena mediana (NF-M) y cadena pesada (NF-H). Diversas alteraciones en la expresión, acumulación o modificaciones post-traduccionales se han relacionado con varias enfermedades neurológicas, como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer.

En la EM en particular, el aumento de los niveles de NF-L en LCR está considerado un marcador de daño axonal y se relaciona con la conversión a EM tras un SNA (161,162). Además, niveles elevados de NF-L en las primeras fases de la enfermedad se han relacionado a su vez con un mayor deterioro cognitivo (163) y con un mayor riesgo de convertir a EM tras un síndrome radiológico aislado (SRA) (164). Además, se ha visto que los pacientes con BOCM-LE también presentan niveles más altos de NF-L en LCR (161). Los estudios anteriores se llevaron a cabo cuantificando la concentración de NF-L en LCR mediante un ELISA comercial. Sin embargo, recientemente ha surgido una nueva tecnología llamada Simoa (*Single Molecule Array*

Technology), que permite cuantificar esta proteína con una mayor sensibilidad. Esto ha permitido cuantificar los niveles de NF-L, no únicamente en el LCR, sino también en las muestras de suero. De este modo, los niveles séricos de NF-L han surgido como un prometedor biomarcador de daño axonal (165,166).

1.9.3 *Chitinase 3-like 1* (CHI3L1)

La quitinasa es una enzima con funciones defensivas en las plantas que degrada la quitina y facilita su protección frente a los patógenos. Las proteínas similares a la quitinasa se han conservado evolutivamente en los mamíferos, a pesar de que carecen de la actividad enzimática que las da nombre. La *Chitinase 3-like 1* (CHI3L1) ha cobrado importancia gracias a que se expresa en las células de carcinoma de mama, macrófagos activados, condrocitos, neutrófilos y células sinoviales (167). En las lesiones cerebrales de los pacientes con EM, se ha visto una elevada expresión de CHI3L1 en las lesiones activas crónicas con una alta actividad inflamatoria, especialmente en los astrocitos reactivos, los macrófagos y las células de la microglía (168). Por el contrario, en las lesiones con baja actividad inflamatoria, la CHI3L1 se expresa de forma débil, puesto que su expresión se restringe al citoplasma de algunos macrófagos y células de la microglía (168). Por su parte, en el LCR las células que expresan con mayor intensidad la CHI3L1 son los monocitos, en concreto aquellos con baja expresión de CD14 (168).

Con respecto a los niveles de CHI3L1 en LCR, estos se encuentran más elevados en los pacientes que tras un SNA convierten a EM, con respecto a los pacientes que no convierten a EM, y además se asocian con un incremento más rápido de la discapacidad (168,169). Sin embargo, los niveles de CHI3L1 no identifican a los

pacientes en riesgo de convertir a EM tras un SRA (164,170). Los pacientes con lesiones que captan Gadolinio también tienen niveles más altos de este biomarcador en LCR (168), al igual que aquellos que presentan un mayor deterioro cognitivo desde las fases iniciales de la enfermedad (163).

En cuanto a la sangre periférica, se ha visto que los niveles plasmáticos de CHI3L1 se encuentran elevados en los pacientes con formas progresivas, con respecto a los pacientes EMRR, y estos niveles más altos se han relacionado con la aparición de un determinado polimorfismo del gen que codifica la CHI3L1 (171).

1.9.4 Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

La proteína glial fibrilar ácida (GFAP) forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos y la elevación de sus niveles en LCR se ha relacionado con un posible daño de estas células y una posible astrocitopatía (172). Como hemos visto, la implicación de los astrocitos en las lesiones del SNC de los pacientes con EM se reconoció desde las primeras descripciones de la enfermedad (8). Sin embargo, ha sido en los últimos años cuando se ha planteado la cuantificación de esta proteína como posible biomarcador en la EM, tanto en LCR, como en suero. De este modo, se ha descrito que los pacientes con formas progresivas presentan niveles más elevados de GFAP en suero que los pacientes con la forma EMRR y que su concentración correlaciona de forma directa con el número de lesiones en RM (173). Además, en los pacientes con EMPP los niveles de GFAP en LCR correlacionan con la duración de la enfermedad; mientras que los niveles en suero correlacionan con el EDSS, tras corregir por el factor edad (174).

1.9.5 Poblaciones celulares en LCR y la sangre periférica

Con el desarrollo de la citometría multiparamétrica han proliferado los estudios inmunofenotípicos del LCR de los pacientes con EM (102), ya que este es un fluido accesible, pero escaso; que en los pacientes con EM se caracteriza por una ligera pleocitosis, lo que ha dificultado doblemente el análisis de las poblaciones celulares presentes en él. No obstante, el LCR refleja los cambios acaecidos en el parénquima del SNC y su obtención carece de los efectos secundarios asociados a la biopsia de tejido cerebral, lo que ha favorecido su análisis en diversas patologías neurales. Los estudios inmunofenotípicos de LCR han perseguido diferentes objetivos, como ahondar en el conocimiento de la patología y la búsqueda de biomarcadores que permitan optimizar el diagnóstico y evaluar el pronóstico del paciente. Sin embargo, aunque se han podido identificar algunos cambios en determinadas poblaciones celulares del LCR de los pacientes con EM, estos tienen dos problemas que impiden su empleo en la práctica clínica habitual: algunos requieren estudios de validación y otros no alcanzan la suficiente especificidad y sensibilidad (102).

Por su parte, la sangre periférica puede estudiarse en paralelo al LCR, con el fin de identificar los cambios en las poblaciones inmunológicas debidas propiamente a la respuesta inflamatoria del SNC y aquellos producidos de manera sistémica. No obstante, también puede analizarse en solitario, con el fin de conocer los cambios periféricos característicos de esta patología. Además, la sangre periférica aporta la gran ventaja de permitir extracciones seriadas. Esto ha favorecido su análisis en la investigación orientada a definir posibles cambios en las poblaciones leucocitarias de sangre periférica capaces de identificar a los pacientes buenos respondedores a los

distintos fármacos disponibles en la EM. En este sentido, se han identificado algunas poblaciones celulares que se modifican en los pacientes que responden bien a algunas terapias, como las células NK CD56 *bright* (117,130). Sin embargo, se requieren estudios multicéntricos de validación que permitan ratificar su posible utilidad clínica.

1.10 INMUNOSENESCENCIA

La inmunosenescencia engloba los cambios relacionados con la edad que se producen en el sistema inmune y que conllevan un incremento de la susceptibilidad a las infecciones, los tumores y las enfermedades autoinmunes, una disminución de la respuesta a las vacunas y una persistente inflamación de bajo grado (conocida como *inflammaging*) (175). El proceso de inmunosenescencia está directamente relacionado con la pérdida de la capacidad de mantener la homeostasis fisiológica propia del envejecimiento (175). Este proceso tiene un componente estocástico (176), a la vez que está controlado por mecanismos genéticos y procesos bioquímicos conservados evolutivamente (177). De esta forma, el proceso de envejecimiento se caracteriza por: la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de la homeostasis proteica, la falta de regulación de la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la alteración de la comunicación celular (177).

El envejecimiento de las células madre subyace el envejecimiento de todos los tejidos y sistemas del organismo y este fenómeno es especialmente patente en aquellos con una elevada tasa de recambio celular, como ocurre en el sistema inmune. Por tanto, el proceso de inmunosenescencia está en primer lugar relacionado con el

envejecimiento de las células madre hematopoyéticas, en el cual participan tanto mecanismos intracelulares como extracelulares (178). Las consecuencias del envejecimiento de las células madre hematopoyéticas incluyen la disminución de su capacidad de autorrenovación y el aumento de la expresión de genes implicados en la diferenciación mieloide, acompañado del descenso en la expresión de genes que participan en la diferenciación linfoide (178). Este hecho afecta por tanto a la generación de linfocitos T y B.

A su vez, la generación de linfocitos T maduros se ve comprometida durante el envejecimiento debido al proceso de involución tímica, que se caracteriza por la disminución del volumen ocupado por las células epiteliales y los timocitos y su sustitución por tejido adiposo, lo que conlleva el descenso de la generación de linfocitos T naïve (179). Además, el proceso de inmunosenescencia se acompaña de cambios en la expresión de marcadores de superficie en los linfocitos T, como la disminución de la expresión de la molécula coestimuladora CD28 (180). Se ha descrito a su vez la expansión de linfocitos T reactivos frente a infecciones víricas latentes como el Citomegalovirus (CMV) (181,182), lo cual también contribuye a la disminución de la respuesta frente a otros virus que potencialmente pueden causar patología grave (183).

El compartimento B también sufre cambios durante el proceso de inmunosenescencia. Estos cambios comprenden desde la disminución de la cantidad de precursores de la línea B en la médula ósea (184), hasta la disminución de la población B naïve, acompañada del incremento de las células B de memoria (185).

La respuesta inmune innata también se ve afectada por el proceso de inmunosenescencia. Así, las células presentadoras de antígeno disminuyen su capacidad fagocítica (186) y de presentación antigénica (187). Sin embargo, se ha visto que las células de la inmunidad innata, como los macrófagos, aumentan su producción de citoquinas proinflamatorias (188). Esto se traduce en un incremento de la concentración de los mediadores solubles proinflamatorios como la IL-6, la IL-1 β o el TNF- α (189). Este fenómeno recibe el nombre de *inflammaging* y se ha relacionado con diversos procesos asociados al envejecimiento (189).

La inmunosenescencia es un proceso gradual y continuo que empieza a una edad variable y que en individuos sanos se hace patente en torno a los 60-70 años (190). Sin embargo, en los pacientes con enfermedades infecciosas (191) y autoinmunes (192) se ha postulado la existencia del fenómeno de inmunosenescencia precoz.

2. HIPÓTESIS

En los pacientes con EM el incremento de la edad se asocia con una disminución de la eficacia de los tratamientos actuales (150) y un aumento de efectos secundarios graves relacionados con dichas terapias (151,154). Además, el curso clínico de estos pacientes cambia con la edad; ya que disminuyen la tasa de brotes, el número de lesiones activas en la sustancia blanca y el número de linfocitos en el SNC; mientras que, paradójicamente se incrementa la discapacidad (2,91). Los estudios de tejido *post-mortem* de pacientes mayores mostraron un descenso del número de linfocitos T y B asociados a las lesiones desmielinizantes y una disminución del número de lesiones activas en la sustancia blanca (91,111).

Estos datos en conjunto sugieren que los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad se modifican con la edad. Sin embargo, los estudios en tejido presentan limitaciones, ya que sólo permiten utilizar un número limitado de marcadores e incluyen a pocos pacientes jóvenes y de edades intermedias. Este hecho ha dificultado la evaluación de estos cambios de manera gradual y la determinación de la edad a la cual se hacen claramente patentes. Por ello, nos planteamos estudiar los cambios inmunológicos relacionados con la edad que se producen en el LCR de los pacientes con EM, ya que este fluido, que se obtiene en la práctica habitual con fines clínicos, refleja los cambios inmunológicos que tienen lugar en el SNC y admite el análisis de distintas poblaciones celulares y moléculas solubles.

Por otro lado, la EM es una enfermedad heterogénea, en la cual se encuentran pacientes con alta y baja respuesta inflamatoria desde las primeras fases de la enfermedad. Nuestro grupo describió que los pacientes con BOCM-LE en LCR mostraban un curso más agresivo (128). Sin embargo, no se ha analizado la evolución

de su curso clínico ni los cambios inmunológicos relacionados con la edad en función de la presencia o ausencia de BOCM-LE.

De este modo, hipotetizamos que dados los cambios clínicos, de respuesta al tratamiento y los descritos por los estudios anatomopatológicos, se podrían evidenciar cambios relacionados con la edad en la respuesta inmunológica de los pacientes con EM. Además, estos cambios podrían verse condicionados por el estado inmunológico previo y podrían identificar nuevos biomarcadores y/o dianas terapéuticas en estos pacientes de edades más avanzadas.

3. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este trabajo fueron:

1. Analizar los cambios relacionados con la edad que se producen en la respuesta inmunitaria en el LCR de los pacientes con EM.
2. Establecer una edad en la cual dichos cambios en la respuesta inmunitaria se ponen de manifiesto.
3. Estudiar cómo influye el distinto perfil inmunológico de los pacientes, según la presencia o ausencia de BOCM-LE, en los cambios inmunológicos relacionados con la edad.
4. Explorar los cambios asociados a la edad que tienen lugar en la sangre periférica de los pacientes con EM y estudiar la posible influencia de las BOCM-LE en dichos cambios.
5. Analizar cómo se relacionan los cambios inmunológicos asociados a la edad con la evolución clínica de los pacientes con EM

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PACIENTES Y MATERIALES

4.1.1 Pacientes y muestras biológicas

Realizamos un estudio transversal de pacientes diagnosticados de EM según criterios de McDonald 2017 (81). Se incluyeron de forma consecutiva 264 pacientes con EM estudiados en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Ninguno de ellos había sido tratado previamente. Se recogieron los siguientes datos demográficos, clínicos y de imagen: sexo, edad, tiempo de evolución, EDSS, MSSS (*Multiple Sclerosis Severity Score*), número de lesiones en T2 y número de lesiones que captan Gadolinio.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Las muestras biológicas se obtuvieron, tras la firma del consentimiento informado, como parte del estudio diagnóstico habitual de los pacientes, empleándose en este estudio el material sobrante.

El LCR se centrifugó a 1.800 rpm durante 10 minutos. El pellet de células se separó para el análisis de las poblaciones linfoides y mieloides. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su procesamiento posterior (estudio de bandas oligoclonales y factores solubles).

Las muestras de suero fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su uso (estudio de bandas oligoclonales y anticuerpos anti CMV IgG).

Para el estudio de subpoblaciones celulares de sangre periférica se recogieron 10 ml de sangre en tubos de heparina de litio. Las células mononucleares se separaron mediante gradiente de densidad y se analizaron mediante citometría de flujo.

4.1.2 Cuantificación de IgG, IgM y albúmina

Materiales usados para la cuantificación de IgG, IgM y albúmina y el cálculo del cociente de albúmina y los índices de IgG e IgM:

- IMAGE Immunochemistry Immunoglobulin G (Beckman Coulter)
- IMAGE Immunochemistry Immunoglobulin M (Beckman Coulter)
- IMAGE Immunochemistry Albúmina (Beckman Coulter)
- Nefelómetro IMAGE 800 (Beckman Coulter)

4.1.3 Detección de bandas oligoclonales

Materiales empleados en la detección de BOCG, BOCM y BOCM-LE:

- Ácido clorhídrico 36% (Merck)
- Ácido sulfúrico 98% (Merck)
- Agarosa Isoelectroenfoque (GE Healthcare)
- Anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch)
- Anti- IgM humana marcada con biotina (Sigma Aldrich)
- Baño calentador
- Baño refrigerador Multitemp II (GE Healthcare)
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (Sigma Aldrich)
- Calentador de aire
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de sodio (Sigma Aldrich)
- Cristales, moldes metacrilato, pinzas
- Cubeta para IEF Multiphor II (GE Healthcare)

- Dimetilformamida (Merck)
- Ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich)
- Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. (Sigma Aldrich)
- Fosfatidilcolina Tipo III-L (Sigma Aldrich)
- Fosfato dipotásico K_2HPO_4 (Panreac)
- Fosfato monopotásico KH_2HPO_4 (Panreac)
- Fuente para electroforesis EPS 3500 (GE Healthcare)
- Glicerol (Merck)
- GelBond (GE Healthcare)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana)
- Membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare)
- Membrana de PVDF (GE Healthcare)
- Metanol (Merck)
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma Aldrich)
- Papel de filtro
- Papel Whatman
- Pharmalyte 5-8 (GE Healthcare)
- Pharmalyte 3-10 (GE Healthcare)
- Pharmalyte 8-10,5 (GE Healthcare)
- Placas de Petri
- Sorbitol (Sigma Aldrich)
- Suero salino fisiológico (Baxter)
- Trizma Base (Sigma Aldrich)

4.1.4 Estudio de poblaciones leucocitarias de LCR y sangre periférica

Los anticuerpos monoclonales utilizados en el análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfoides y mieloides de LCR y sangre periférica se detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: descripción de los anticuerpos monoclonales empleados en los estudios de citometría de flujo.

Antígeno	Fluorocromo conjugado	Isotipo	Clon	Procedencia
CD3	BV421	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	UCHT1	Becton Dickinson
CD3	PerCP	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	SK7	Becton Dickinson
CD5	APC	IgG _{2a} κ de ratón BALB/c	L17F12	Becton Dickinson
CD8	APC-H7	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	SK1	Becton Dickinson
CD14	APC-H7	IgG _{2b} κ de ratón BALB/c	MφP9	Becton Dickinson
CD14	FITC	IgG _{2b} κ de ratón BALB/c	MφP9	Becton Dickinson
CD16	PE-Cy TM 7	IgG ₁ κ de ratón CDF1	3G8	Becton Dickinson
CD19	PE-Cy TM 7	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	SJ25C1	Becton Dickinson
CD24	PE	IgG _{2a} κ de ratón	ML5	Becton Dickinson
CD25	PE	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	M-A251	Becton Dickinson
CD27	FITC	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	M-T271	Becton Dickinson
CD28	PE-Cy TM 5	IgG ₁ κ de ratón C3HxBALB/c	CD28.2	Becton Dickinson
CD38	PE-Cy TM 5	IgG ₁ κ de ratón	HIT2	Becton Dickinson
CD45	V500	IgG ₁ κ de ratón	HI30	Becton Dickinson
CD45RO	APC	IgG _{2a} κ de ratón BALB/c	UCHL1	Becton Dickinson

CD56	APC	IgG _{2b} κ de ratón BALB/c	NCAM16	Becton Dickinson
CD57	FITC	IgMκ de ratón	HNK1	Becton Dickinson
CD69	BV421	IgG ₁ κ de ratón	FN50	Becton Dickinson
CD103	FITC	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	Ber-ACT8	Becton Dickinson
CD127	BV421	IgG ₁ κ de ratón	HIL-7R-M21	Becton Dickinson
CD197 (CCR7)	PE	IgG _{2a} de ratón	150503	Becton Dickinson
CD274 (PD-L1)	PE-Cy TM 7	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	MIH1	Becton Dickinson
GM-CSF	PE	IgG _{2a} de rata Lewis	BVD2-21C11	Becton Dickinson
IFN-γ	FITC	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	4S.B3	Becton Dickinson
IL-1β	FITC	IgG ₁ κ de ratón BALB/c	AS10	Becton Dickinson
IL-6	BV421	IgG ₁ de rata	MQ2-13A5	Becton Dickinson
IL-10	PE	IgG _{2a} κ de rata	JES3-19F1	BioLegend
IL-12	APC	IgG ₁ de ratón	C11.5	Becton Dickinson
IL-17	APC	IgG _{2b} de ratón	41809	R&D Systems
TNF-α	PerCP-Cy TM 5.5	IgG ₁ κ de ratón	MAb11	Becton Dickinson

4.1.4.1 Inmunofenotipo de LCR:

Materiales utilizados para el análisis de poblaciones celulares de LCR:

- Anticuerpos monoclonales
- Suero salino fisiológico (Baxter)
- Tubos de polipropileno estériles

4.1.4.2 Inmunofenotipo de sangre periférica

Materiales empleados para el análisis de poblaciones celulares de sangre periférica:

- Anticuerpos monoclonales
- Lymphoprep™ (Alere Technologies AS)
- Gentamicina (Braun)
- Glutamina (Thermo Fisher Scientific)
- RPMI (GIBCO)
- Suero salino fisiológico (Baxter)
- Suero de ternera fetal Hyclone (GE Healthcare Life Sciences)
- Tubos de polipropileno estériles

4.1.4.3 Producción de citoquinas intracelulares:

Materiales utilizados para el estudio de la producción de citoquinas intracelulares:

- Anticuerpos monoclonales
- BD Cytofix™ (Becton Dickinson)
- BD Cytoperm™ (Becton Dickinson)
- BD GolgiPlug™ (Becton Dickinson)
- BD GolgiStop™ (Becton Dickinson)
- Gentamicina (Braun)
- Glutamina (Thermo Fisher Scientific)
- Incubador (Thermo Fisher Scientific)
- Ionomicina (Sigma Aldrich)

- Lymphoprep™ (Alere Technologies AS)
- Phorbol myristic acetate (PMA) (Sigma Aldrich)
- RPMI (GIBCO)
- Suero Salino (Baxter)
- Suero de ternera fetal Hyclone (GE Healthcare Life Sciences)
- Tubos de polipropileno estériles

4.1.5 Determinación de factores solubles en LCR

Materiales empleados para el estudio de factores solubles en LCR:

- GFAP Human Elisa Kit (Bertin Bioreagent)
- Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)
- Human PD-L1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)
- MicroVue YKL-40 (CHI3L1) ELISA Kit (Quidel)
- NF-Light (Neurofilament light) ELISA kit (Uman Diagnostics)

4.1.6 Cuantificación de anti-CMV IgG en suero

Materiales utilizados para la cuantificación de anti-CMV IgG en suero:

- CMV IgG Test System (Zeus Scientific)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cuantificación de IgG, IgM y albúmina

Las concentraciones de IgG, IgM y albúmina de LCR y suero se determinaron utilizando un nefelómetro IMAGE (Beckman Coulter)

El cociente de albúmina se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cociente de albúmina} = (\text{Albúmina LCR} / \text{Albúmina suero}) \times 1.000$$

El índice de IgG se estimó con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de IgG} = (\text{IgG LCR} / \text{IgG suero}) / (\text{Albúmina LCR} / \text{Albúmina suero})$$

El índice de IgM se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de IgM} = (\text{IgM LCR} / \text{IgM suero}) / (\text{Albúmina LCR} / \text{Albúmina suero})$$

4.2.2 Detección de bandas oligoclonales de IgG (BOCG)

La detección de las bandas oligoclonales de IgG (BOCG) se llevó a cabo siguiendo un método puesto a punto en nuestro laboratorio, basado en un isoelectroenfoque seguido de inmunodetección (193). En la Figura 4.1 se detallan los cuatro patrones de BOCG que se pueden encontrar en los individuos sanos y en los pacientes con patología neurológica.

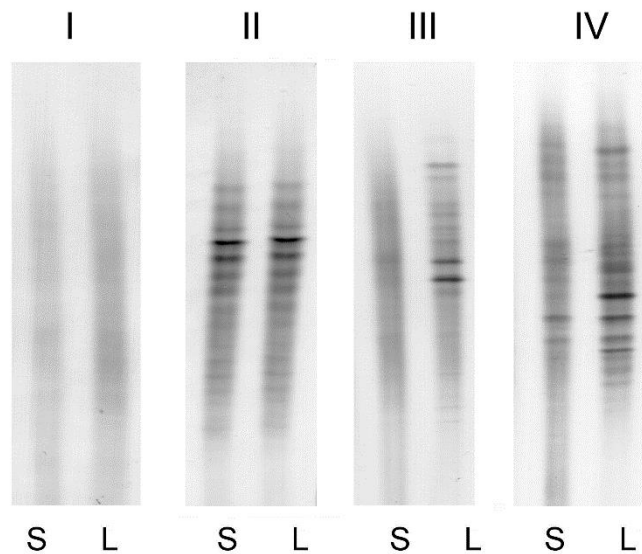


Figura 4.1: ejemplos representativos de los cuatro patrones de bandas oligoclonales de IgG detectados en individuos sanos y en patologías neurológicas. S: suero; L: líquido cefalorraquídeo.

Patrón I: patrón policlonal en LCR y suero, característico de individuos sanos.

Patrón II: idéntico patrón oligoclonal en suero y LCR (patrón en espejo), que indica una respuesta humoral sistémica con paso de inmunoglobulinas del suero al LCR. Frecuente en enfermedades inflamatorias distintas de EM.

Patrón III: patrón oligoclonal en LCR y policlonal en suero. Este patrón es típico de la EM, aunque no es patognomónico.

Patrón IV: patrón oligoclonal en suero y LCR, pero con bandas adicionales en el LCR. Este patrón puede encontrarse en los pacientes con EM, aunque es más frecuente en infecciones del SNC.

4.2.3 Detección de bandas oligoclonales de IgM (BOCM)

La detección de bandas oligoclonales de IgM (BOCM) se realizó también siguiendo un método puesto a punto en nuestro laboratorio (194). En la Figura 4.2 se muestran los cuatro posibles patrones de BOCM. Los patrones III y IV indican síntesis intratecal de IgM.

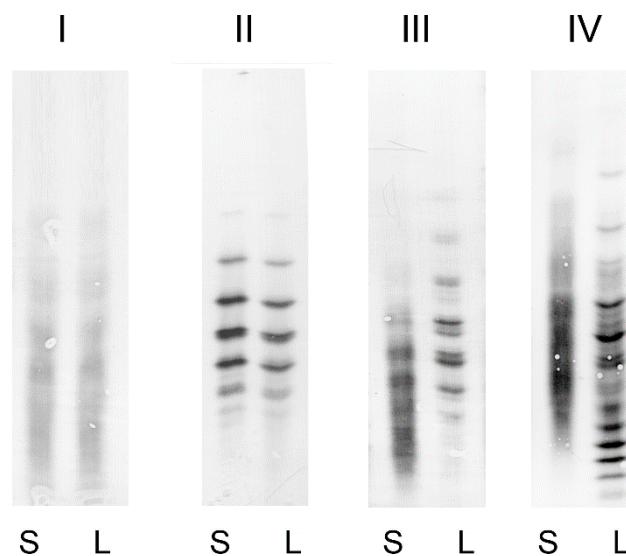


Figura 4.2: ejemplos representativos de los cuatro patrones de bandas oligoclonales de IgM detectados en individuos sanos y en patologías neurológicas. S: suero; L: líquido cefalorraquídeo.

4.2.4 Detección de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE)

El método para la detección de bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas (BOCM-LE) también fue descrito en nuestro laboratorio (128).

4.2.5 Estudio de poblaciones leucocitarias en LCR

Para el estudio celular del LCR contamos con un volumen de entre 4 y 10 ml de cada uno de los pacientes analizados. Dicho volumen se repartió en un máximo de tres tubos de polipropileno para el marcaje de antígenos de superficie y dos tubos adicionales también de polipropileno para el estudio de la producción intracelular de citoquinas. Debido a la escasez del LCR, no se pudieron estudiar todos los tubos en cada uno de los pacientes. El número de pacientes a los que se les realizó cada marcaje se detalla en la Tabla 4.2. Estos tubos se centrifugaron a 1.800 rpm durante 10 minutos, recogimos el sobrenadante para la detección de BOC y factores solubles; mientras que resuspendimos el pellet celular para su marcaje, siguiendo el panel que se detalla en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: panel utilizado para el marcaje de antígenos de superficie y número de pacientes incluido en cada tubo.

Tubo (n)		Marcadores						
1	CD103	CCR7	CD3	-	CD45RO	CD8	CD69	CD45
(n=118)	FITC	PE	PerCP		APC	APC-H7	BV421	V500
2	CD27	CD24	CD38	CD19	CD5	-	-	CD45
(n=197)	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC			V500
3	CD14	CD25	CD3	CD16	CD56	CD8	CD127	CD45
(n=220)	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421	V500

n: número de pacientes

Incubamos las suspensiones celulares con los anticuerpos monoclonales, empleando las concentraciones óptimas indicadas por el fabricante, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, lavamos con suero salino fisiológico y resuspendimos las células en 200 µl de suero salino fisiológico. A continuación, analizamos las células en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson). Los valores medios de autofluorescencia se establecieron mediante el uso de controles negativos de isotipo apropiados. Una vez adquiridas las muestras, se analizaron los datos recogidos con el *software* FACSDiva V.8.0 (Becton Dickinson).

En cada tubo se llevó a cabo una estrategia de selección concreta para identificar a las poblaciones celulares de interés, pero en todos los casos se seleccionó en primer lugar la población mononuclear (Figura 4.3). Para ello, se combinaron los parámetros FSC (cuantifica el tamaño celular) y SSC (cuantifica la complejidad celular) para definir las células mononucleares (Figura 4.3 A). Posteriormente, eliminamos los *dupletes* (posibles agregados celulares) y seleccionamos los *singletes* mediante la combinación de los parámetros FS en altura y área (Figura 4.3 B). Por último, seleccionamos la población positiva de intensidad intermedia-alta para el antígeno pan-leucocitario CD45 y dentro de ella a la población linfocitaria (Figura 4.3 C).

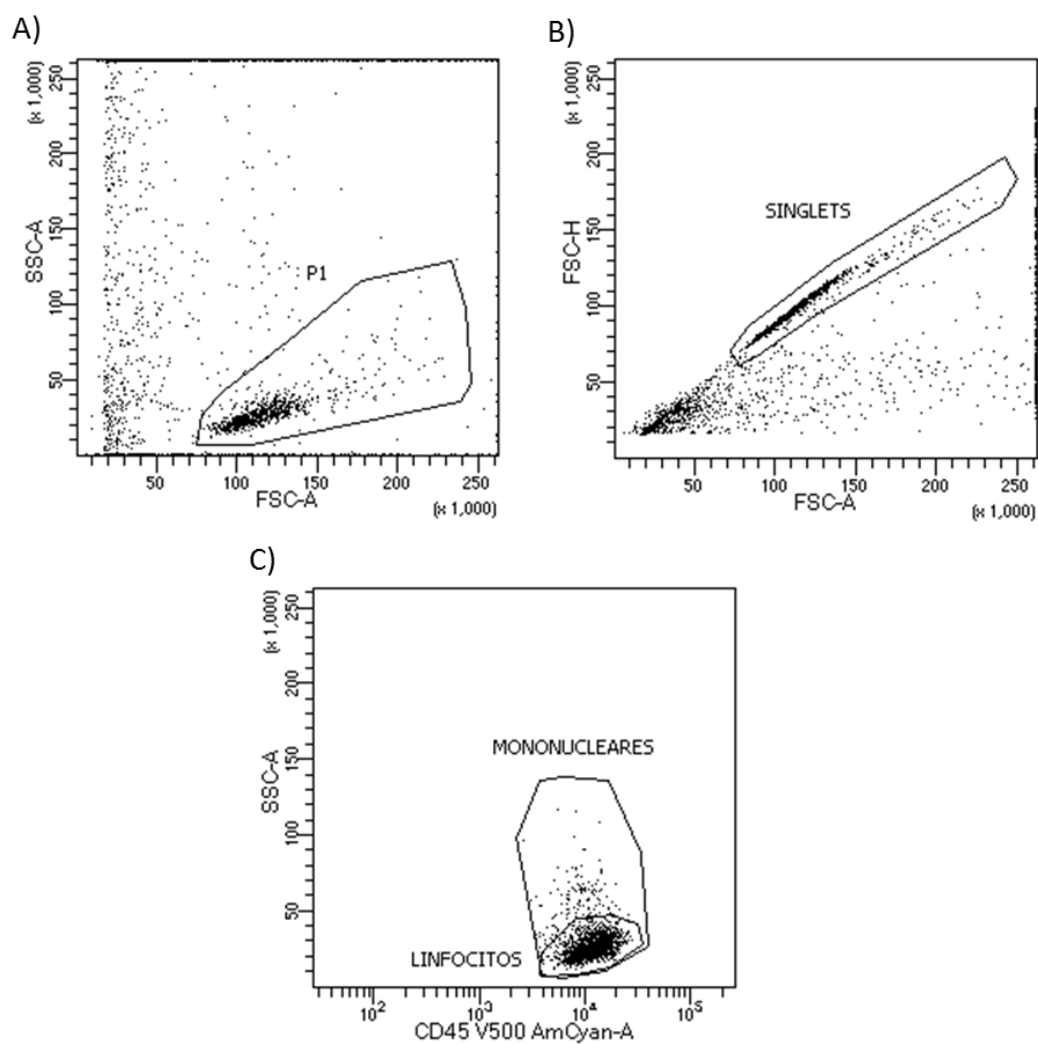


Figura 4.3: selección de las células mononucleares del líquido cefalorraquídeo. (A) En primer lugar, definimos la población mononuclear mediante FSC y SSC. (B) Eliminamos los *dupletes* y seleccionamos los *singletes* gracias a la combinación de los parámetros FSC-H y FSC-A. (C) Seleccionamos la población mononuclear como aquella positiva de intensidad intermedia-alta para CD45 y dentro de ella delimitamos a la población linfocitaria.

En las siguientes figuras se explican las estrategias utilizadas para identificar a las distintas poblaciones celulares de interés.

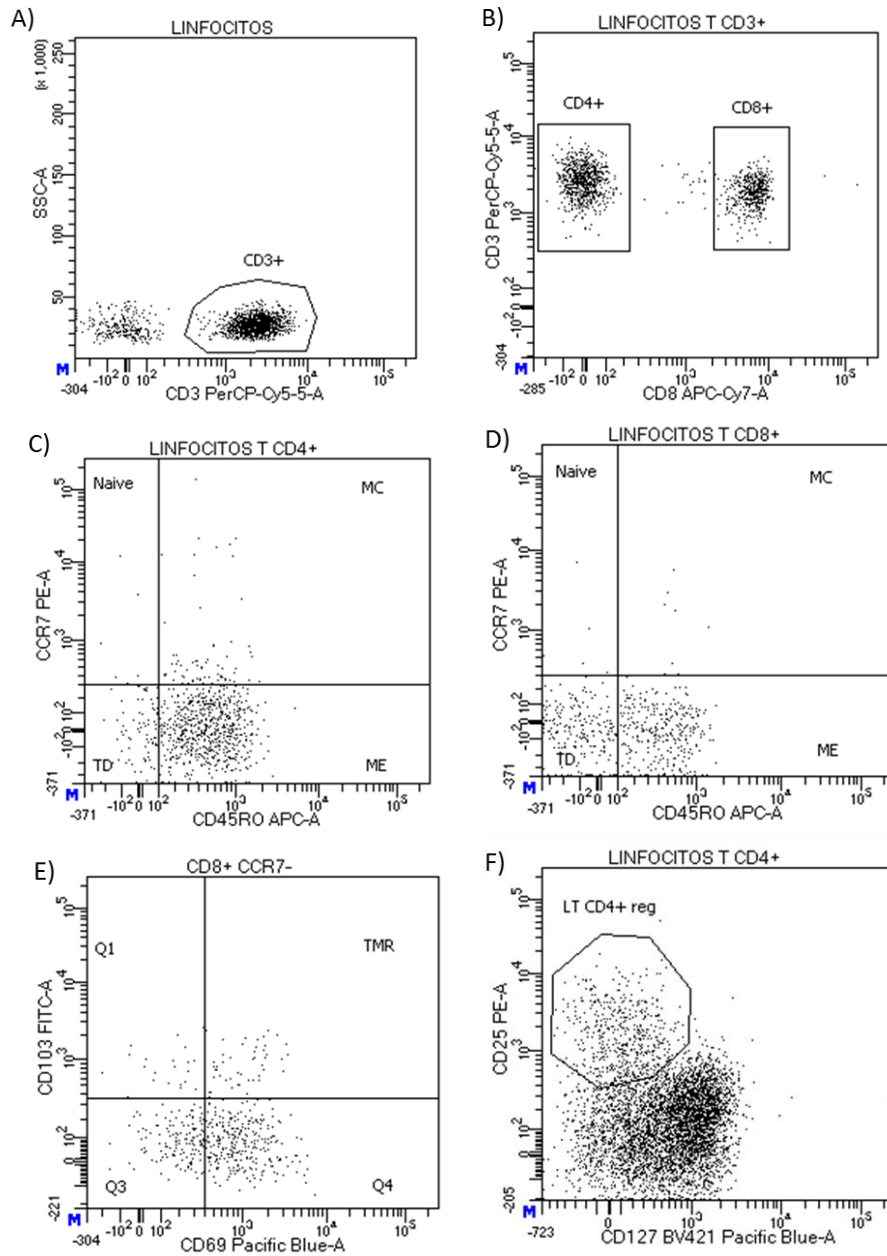


Figura 4.4: estrategia de selección de las diferentes poblaciones de linfocitos T. (A) A partir de los linfocitos seleccionamos los linfocitos T CD3+. (B) A continuación, definimos las poblaciones CD4+ y CD8+. (C, D) Dentro de estas distinguimos las subpoblaciones: naïve, memoria central (MC), memoria efectora (ME) y terminalmente diferenciadas (TD) La población efectora se definió como ME+TD. (E) Además, dentro de la población CD8+ CCR7- definimos las células TMR (memoria residente). (F) Por último, dentro de los T CD4+ analizamos la población reguladora (LT CD4+ reg).

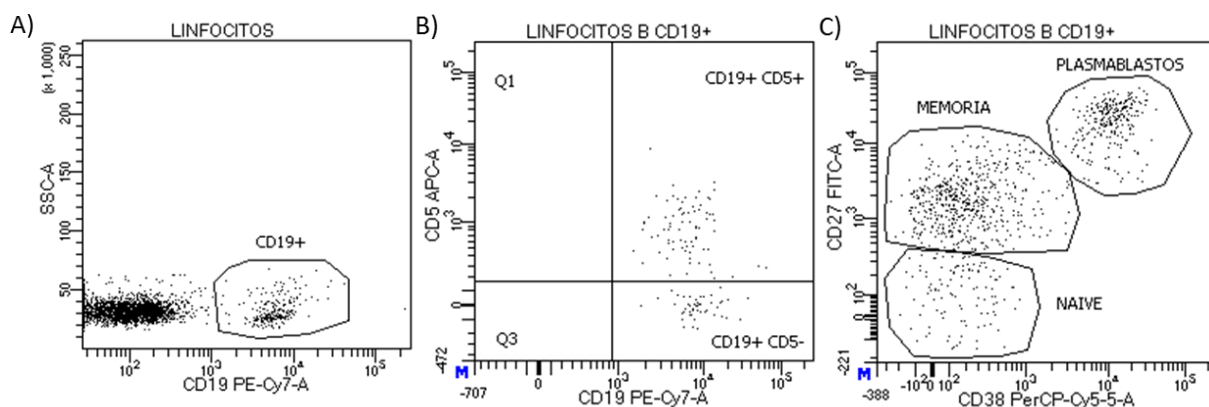


Figura 4.5: estrategia de selección de las diferentes poblaciones de linfocitos B. (A) A partir de los linfocitos seleccionamos los linfocitos B CD19+. (B) A continuación, definimos las poblaciones CD5+ y CD5-. (C) A su vez, a partir de los linfocitos B CD19+ definimos las poblaciones naïve, de memoria y plasmablastos.

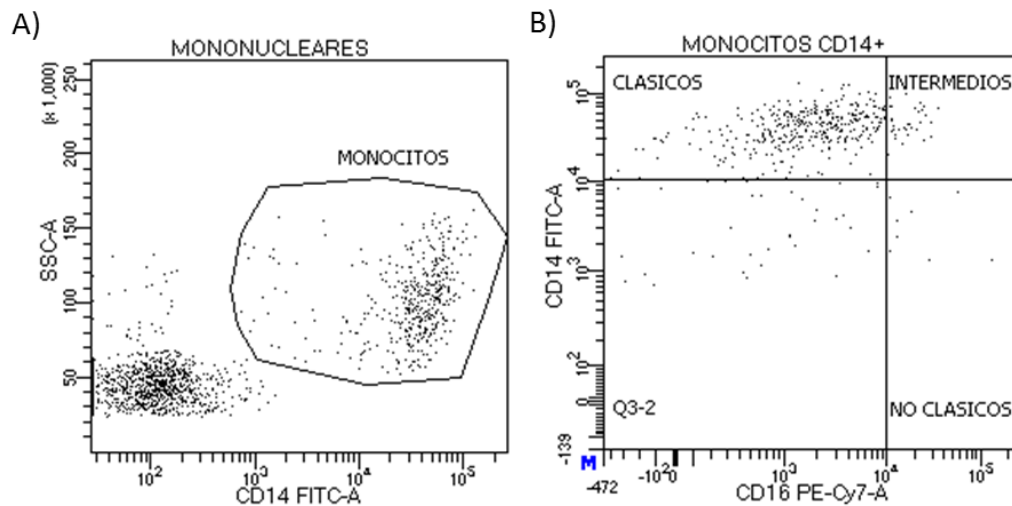


Figura 4.6: estrategia de selección de las diferentes poblaciones de monocitos. (A) A partir de las células mononucleares, definimos la población de monocitos. (B) A continuación, combinamos la expresión de CD14 y CD16 para seleccionar los distintos tipos de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos.

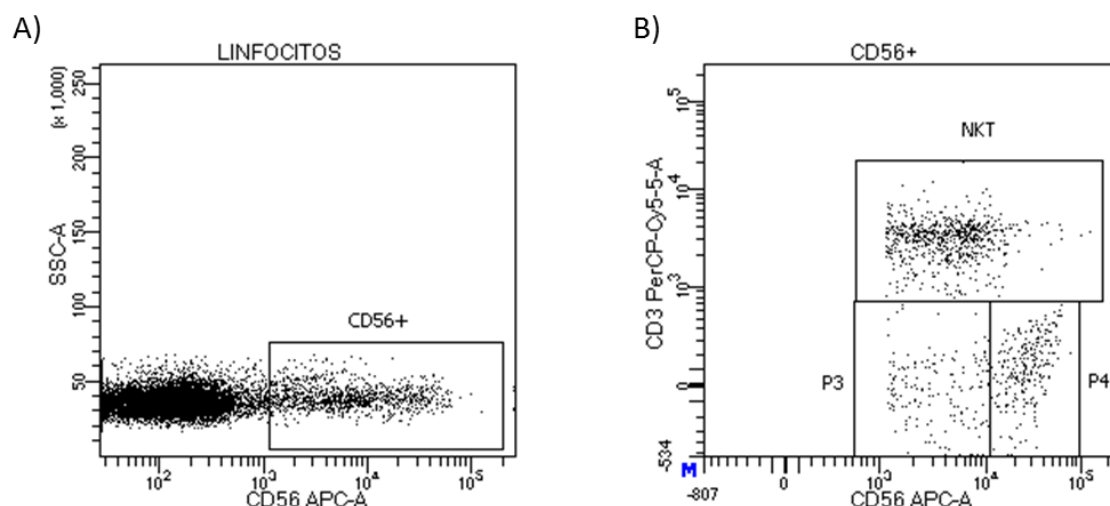


Figura 4.7: estrategia de selección de las diferentes células *Natural Killer* (NK). (A) A partir de las células con tamaño y granularidad de célula linfocítica, seleccionamos las células CD56+. (B) Seguidamente, combinamos la expresión de CD56 y CD3 para seleccionar las células NKT, las células NK CD56 *dim* (P3) y las células NK CD56 *bright* (P4).

4.2.5.1 Detección intracelular de citoquinas por parte de los linfocitos T y B

En el estudio de la producción de citoquinas intracelulares por parte de los linfocitos T se incluyeron 143 pacientes. Además, en 55 de los 143 también se analizó la producción de citoquinas intracelulares por parte de los linfocitos B. Para ello, se centrifugó a 1.800 rpm durante 10 minutos el volumen de LCR asignado para este análisis. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo y se activaron las células. Para ello se añadió PMA (50ng/ml) e ionomicina (750ng/ml) y se bloqueó el transporte de proteínas con 2 μ l de BD GolgiPlug™ (Becton Dickinson) y 0,7 μ l de BD GolgiStop™ (Becton Dickinson). Las muestras se incubaron durante 4 horas en un incubador a 37°C. Pasadas las 4 horas, se lavaron las células y se resuspendieron en suero salino fisiológico. A continuación, se incubaron durante 30 minutos a 4°C y en

oscuridad con los anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie detallados en la Tabla 4.3, utilizando las concentraciones indicadas por el fabricante.

Tabla 4.3: panel utilizado para el marcaje de antígenos de superficie en el tubo de producción intracelular de citoquinas por los linfocitos T y B.

Tubo	Marcadores			
Citoquinas linfocitos T y B	CD19 PE-Cy7	CD8 APC-H7	CD3 BV421	CD45 V500

A continuación, las células se lavaron de nuevo con suero salino fisiológico y se incubaron con 200 µl de BD Cytofix™ (Becton Dickinson) durante 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 3 ml de BD Cytoperm™ (Becton Dickinson) diluido 1/10 y se incubaron durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad con los anticuerpos monoclonales frente a citoquinas intracelulares detallados en la Tabla 4.4. Se emplearon las concentraciones óptimas indicadas por el fabricante, excepto para IFN-γ FITC y GM-CSF PE, para los cuales se titularon los anticuerpos.

Tabla 4.4: panel utilizado para el marcaje de antígenos intracelulares en el tubo de producción intracelular de citoquinas por los linfocitos T y B.

Tubo	Marcadores				
Citoquinas linfocitos T y B	IFN-γ FITC	GM-CSF PE	TNF-α PerCP Cy5.5	IL-17 APC	

Por último, las células se lavaron con 3 ml de BD Cytoperm™ (Becton Dickinson) diluido 1/10, se resuspendieron en 200 µl de dicha solución y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson). El análisis multiparamétrico se llevó a cabo con el *software* FACSDiva V.8.0 (Becton Dickinson). Para ello, definimos la población linfocitaria (Figura 4.3) y continuamos con la estrategia de selección de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 4.4) y linfocitos B CD19+ (Figura 4.5) como se ha explicado anteriormente. En las siguientes figuras se detallan los puntos de corte establecidos para definir las poblaciones productoras de citoquinas.

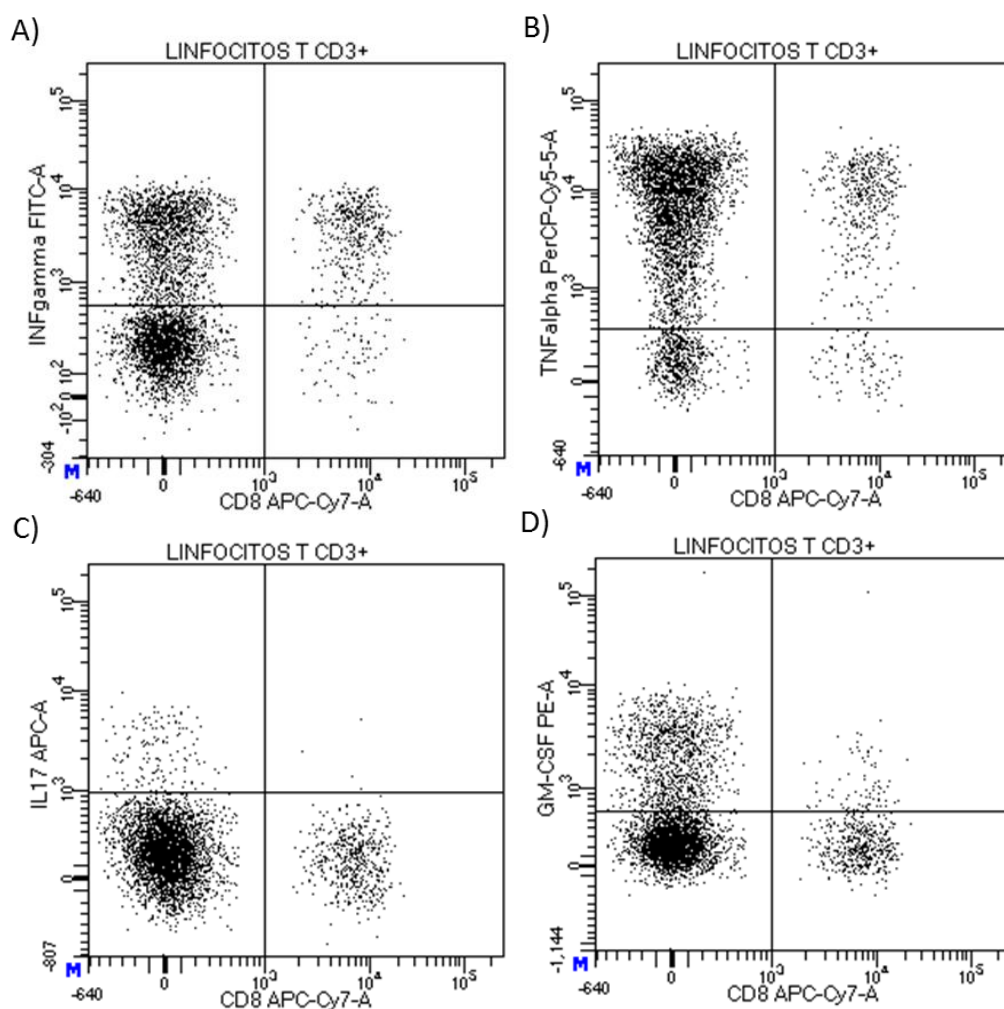


Figura 4.8: ejemplo de producción de citoquinas por parte de los linfocitos T CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha). Producción de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-17 (C) y GM-CSF (D).

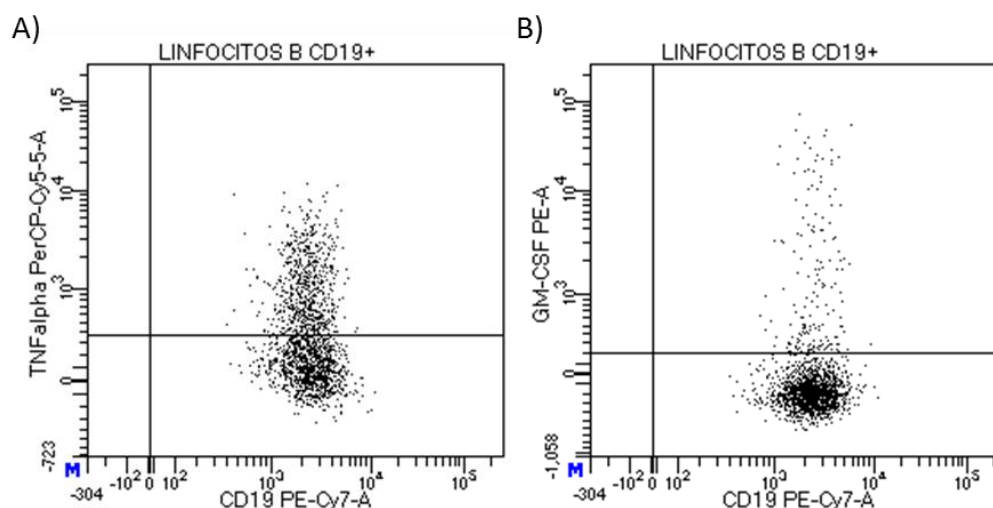


Figura 4.9: ejemplo de producción de TNF- α (A) y GM-CSF (B) por parte de los linfocitos B.

4.2.5.2 Producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos

El análisis de la producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos se llevó a cabo en 58 pacientes de los 264 incluidos en este estudio. En primer lugar, se centrifugó a 1.800 rpm durante 10 minutos el volumen de LCR asignado para este análisis. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo y se bloqueó el transporte de proteínas con 2 μ l de BD GolgiPlug™ (Becton Dickinson) y 0,7 μ l de BD GolgiStop™ (Becton Dickinson). Las muestras se incubaron durante 4 horas en un incubador a 37°C. Pasadas las 4 horas, se siguió el mismo protocolo descrito para el estudio de la producción intracelular de citoquinas por parte de los linfocitos, con la salvedad de los anticuerpos monoclonales utilizados. Los anticuerpos empleados en este estudio se detallan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: panel utilizado para el estudio de la producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos.

Antígeno	Marcadores				
Superficie	CD14 APC-H7	CD45 V500			
Intracelular	IL-1 β FITC	IL-10 PE	TNF α PerCP Cy5.5	IL-12 APC	IL-6 BV421

4.2.6 Estudio de poblaciones mononucleares en sangre periférica

En 94 pacientes de los 264 incluidos en el estudio se analizaron a su vez las poblaciones mononucleares de sangre periférica. Para ello, en primer lugar se separaron estas a partir de 10 ml de sangre heparinizada, mediante gradiente de densidad con Lymphoprep™ (Alere Technologies AS). Para ello se centrifugó durante 30 minutos a 1.800 rpm. Se recuperó el halo celular, el cual se lavó tres veces y se resuspendió en 1 ml de medio completo. Finalmente, se contaron las células en una cámara de Neubauer y se distribuyó un millón de células por tubo para su marcaje posterior, siguiendo el panel detallado en la Tabla 4.2. Las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Finalmente, se lavaron y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson). El *software* y las estrategias de análisis son iguales que los detallados para el LCR. Sin embargo, en la sangre periférica no se incluyó el estudio de la población TRM, ya que sólo se encuentran en los tejidos periféricos; pero se añadió el estudio de linfocitos B reguladores a partir de los linfocitos B CD19+ (Figura 4.10).

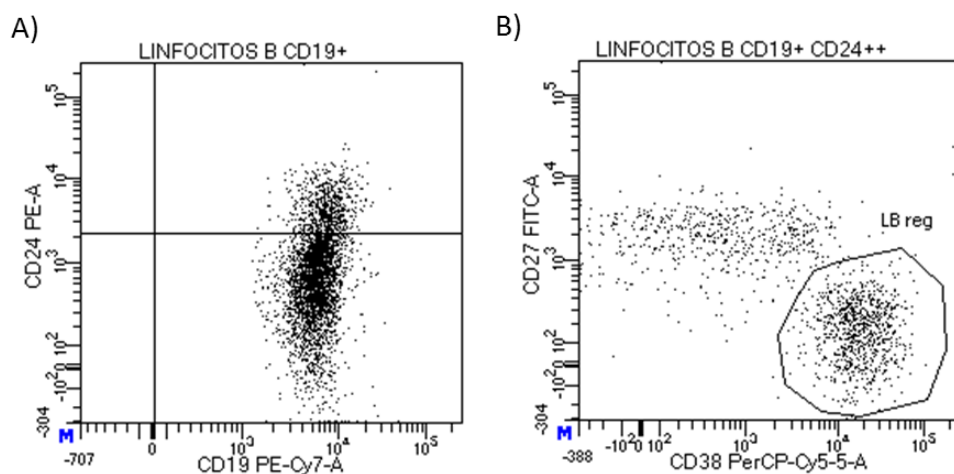


Figura 4.10: estrategia de selección de los linfocitos B reguladores. A partir de los linfocitos B, definimos la población CD24++ (A) y dentro de ellos seleccionamos a los linfocitos B reguladores (LB reg) (B).

Además, en 21 pacientes de los 94 se añadió un tubo con el fin de estudiar el porcentaje de células senescentes (Tabla 4.6)

Tabla 4.6: panel utilizado para el estudio de las células senescentes en sangre periférica.

Tubo	Marcadores						
Senescentes	CD57	CCR7	CD28	CD45RO	CD8	CD3	CD45
	FITC	PE	PECy5	APC	APC H7	BV421	V500

En este caso, la estrategia de selección para identificar a las células senescentes se describe en la Figura 4.11.

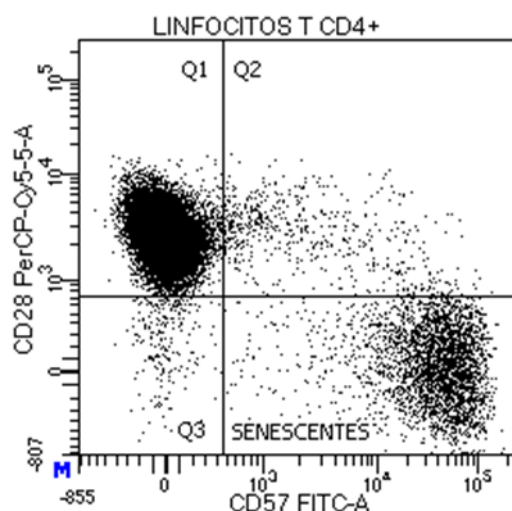


Figura 4.11: estrategia de selección de los linfocitos T CD4+ senescentes. A partir de los linfocitos T CD4+, combinamos la expresión de CD28 y CD57 para definir la población senescente como CD28- CD57+.

4.2.7 Determinación de factores solubles en LCR

Se cuantificaron mediante ELISA en LCR los factores solubles que se enumeran a continuación. Todas las muestras se analizaron en duplicado. Los ELISAs se realizaron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, salvo las variaciones que se detallan más abajo.

Determinamos los niveles de GFAP en 138 muestras de LCR utilizando GFAP Human Elisa Kit (Bertin Bioreagent).

Los niveles de Activina A de LCR se cuantificaron en 184 pacientes mediante Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA Kit (R&D Systems).

Para determinar los niveles de PD-L1 en 147 muestras de LCR empleamos Human PD-L1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems).

Los niveles de CHI3L1 de LCR se cuantificaron en 146 pacientes mediante MicroVue YKL-40 (CHI3L1) ELISA Kit (Quidel).

Por último, determinamos los niveles de NF-L en LCR de 153 pacientes, para lo cual empleamos NF-Light (Neurofilament light) ELISA kit (Uman Diagnostics). Las muestras de LCR se diluyeron 1:2 y 1:5.

4.2.8 Cuantificación de anti-CMV IgG en suero

Para la cuantificación de anti-CMV IgG en suero utilizamos CMV IgG Test System (Zeus Scientific). Se analizaron 166 muestras de suero por duplicado, siguiendo las condiciones del fabricante. Expresamos los resultados como *Index Value* (IV) que calculamos empleando la siguiente fórmula:

$$IV = (10 \times Absorbancia) / (Punto de corte)$$

4.2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo en el *software* GraphPad Prism 6.0. En las variables cualitativas se empleó el test exacto de Fisher para analizar las diferencias entre dos grupos. Las variables cuantitativas se expresaron como media±desviación estándar (M±DS) y las diferencias entre dos grupos se analizaron mediante el test U de Mann-Whitney. En los estudios de correlación se calculó el coeficiente de correlación

de Spearman. Se consideraron significativas las $p < 0,01$; excepto cuando subdividimos a los pacientes en función de las BOCM-LE y la edad de 45 años, que se consideraron significativas las $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

Nos propusimos analizar los cambios inmunológicos relacionados con la edad que ocurren en los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM). Para ello analizamos los cambios en la respuesta inmune innata y adaptativa en 264 pacientes con EM, de los cuales 234 mostraban la forma remitente-recurrente (EMRR), 2 la forma secundariamente progresiva (EMSP) y 28 la forma primariamente progresiva (EMPP). Las características clínicas y demográficas de los pacientes se detallan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.

Variable	EM (n=264)
Sexo (F/M)	150/114
Edad (años) (Media±DS)	39,34±11,03
Tiempo de evolución (meses) (Media±DS)	38,30±76,97
BOCG (pos/neg)	241/23
BOCM (pos/neg)	115/149
BOCM-LE (pos/neg)	72/192
EMRR/EMSP/EMPP	234/2/28
EDSS (Media±DS)	1,98±1,38
MSSS (Media±DS)	4,40±2,51
Lesiones en T2 (Media±DS)	23,29±19,93
Lesiones captantes (Media±DS)	1,43±3,24

EM: Esclerosis Múltiple; F: femenino; M: masculino; DS: desviación estándar; BOCG: bandas oligoclonales de IgG, BOCM: bandas oligoclonales de IgM; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; pos: positivo; neg: negativo.

5.2 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS PRESENTES EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE LOS PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En primer lugar, analizamos la relación de la edad con las principales poblaciones leucocitarias presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EM. Estudiamos la correlación de la edad con el número de células/ml y el porcentaje calculado sobre el total de células mononucleares (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: correlaciones de la edad con las principales poblaciones leucocitarias presentes en el LCR de los pacientes con EM

	% células		Nº células/ml	
	r	p	r	p
Mononucleares			-0,40	<0,0001
Monocitos	0,33	<0,0001	-0,10	ns
Linfocitos	-0,25	<0,0001	-0,40	<0,0001
NK	0,06	ns	-0,32	<0,0001

r: coeficiente de correlación de Spearman; NK: células *Natural Killer*. % células calculado sobre el total de células mononucleares.

Observamos que el número total de células mononucleares/ml disminuía al aumentar la edad y que dicho descenso se debía a la disminución del número de linfocitos, además de a la bajada de las células NK (Tabla 5.2). Además, este descenso

se acompañaba de una disminución del porcentaje de linfocitos (Tabla 5.2). En cambio, el número de monocitos no se modificó y su porcentaje se vio incluso incrementado con la edad (Tabla 5.2).

5.2.1 Linfocitos T CD4

Nos propusimos estudiar los posibles cambios relacionados con la edad de las diferentes subpoblaciones de linfocitos. En primer lugar analizamos los linfocitos T CD4 totales, cuyo número total descendía con la edad en los pacientes con EM (Figura 5.1).

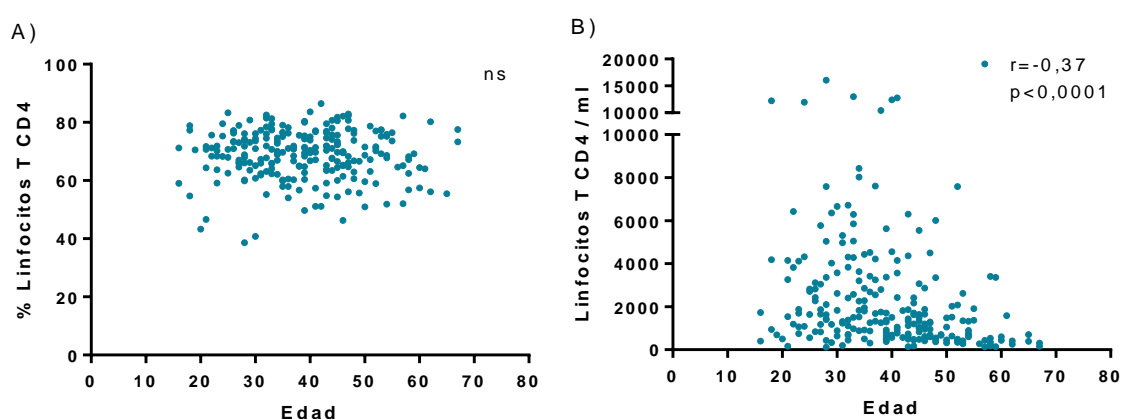


Figura 5.1: correlación de la edad con los linfocitos T CD4 presentes en el LCR de los pacientes con EM analizados en porcentaje sobre el total de linfocitos (A) y en número de células/ml (B).

Posteriormente, consideramos las siguientes subpoblaciones de linfocitos T CD4: naïve, memoria central (MC), memoria efectora (ME), terminalmente diferenciadas (TD), efectoras y reguladoras (Tabla 5.3). No obtuvimos ninguna correlación significativa en los porcentajes celulares. Sin embargo, a excepción de los

linfocitos TD, los números de células/ml de las diferentes subpoblaciones de células CD4+ analizadas mostraban una correlación inversa con la edad (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: correlación de la edad con las principales subpoblaciones de linfocitos T CD4 presentes en el LCR de los pacientes con EM

	% células		Nº células/ml	
	r	p	r	p
Linfocitos T CD4 naïve	-0,04	ns	-0,37	<0,0001
Linfocitos T CD4 MC	-0,14	ns	-0,37	<0,0001
Linfocitos T CD4 ME	-0,13	ns	-0,41	<0,0001
Linfocitos T CD4 TD	-0,08	ns	-0,22	ns
Linfocitos T CD4 efectores	0,13	ns	-0,40	<0,0001
Linfocitos T CD4 reguladores	0,10	ns	-0,26	<0,0001

r: coeficiente de correlación de Spearman; MC: memoria central; ME: memoria efectora; TD: terminalmente diferenciadas. % células calculado sobre el total de linfocitos.

Por último, estudiamos la producción intracelular por parte de los linfocitos T CD4 de las siguientes citoquinas: IFN- γ , TNF- α , IL-17 y GM-CSF. No obtuvimos ninguna correlación significativa en el caso del porcentaje de linfocitos T CD4 productores de citoquinas. Sin embargo, sí obtuvimos correlaciones inversas significativas con el número de células productoras de citoquinas/ml, ya que todos ellos descendían con la edad (Tabla 5.4).

Tabla 5.4: correlaciones de la edad con los linfocitos T CD4 productores de citoquinas.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD4 IFN- γ	0,10	ns	-0,31	0,0002
Linfocitos T CD4 TNF- α	0,06	ns	-0,32	<0,0001
Linfocitos T CD4 IL-17	-0,10	ns	-0,35	<0,0001
Linfocitos T CD4 GM-CSF	0,02	ns	-0,42	0,002

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.2.2 Linfocitos T CD8

A continuación, analizamos la influencia de la edad en los linfocitos T CD8, cuyo número total también descendía en relación al incremento de esta (Figura 5.2).

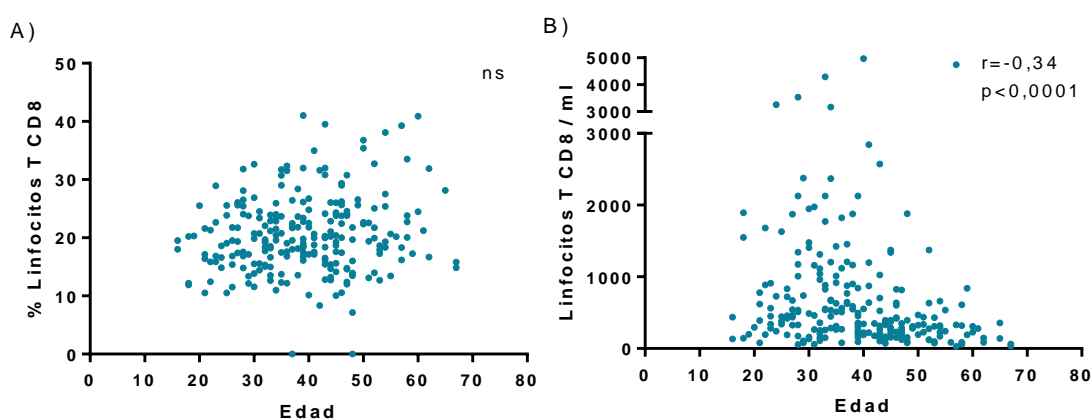


Figura 5.2: correlación de la edad con los linfocitos T CD8 presentes en el LCR de los pacientes con EM analizados en porcentaje sobre el total de linfocitos (A) y en número de células/ml (B).

Además, estudiamos las subpoblaciones de linfocitos T CD8: naïve, MC, ME, TD, efectoras y memoria residente (MR) (Tabla 5.5). El número de células/ml descendía en todas las subpoblaciones estudiadas, exceptuando la población T CD8 MR (Tabla 5.5). Cuando estudiamos los porcentajes de dichas poblaciones, sólo detectamos un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 MR en relación a la edad (Tabla 5.5). Esto podría indicar que, con el paso de los años, se produciría un enriquecimiento relativo de dicha población en el LCR de los pacientes con EM que contribuiría al mantenimiento de la respuesta inmunitaria frente a distintos patógenos en el sistema nervioso central (SNC).

Tabla 5.5: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de linfocitos T CD8.

	% células		Nº células/ml	
	r	p	r	p
Linfocitos T CD8 naïve	-0,08	ns	-0,41	<0,0001
Linfocitos T CD8 MC	-0,04	ns	-0,35	0,0001
Linfocitos T CD8 ME	0,03	ns	-0,34	0,0002
Linfocitos T CD8 TD	0,09	ns	-0,37	<0,0001
Linfocitos T CD8 efectores	0,12	ns	-0,37	<0,0001
Linfocitos T CD8 MR	0,32	0,005	-0,15	ns

r: coeficiente de correlación de Spearman; MC: memoria central; ME: memoria efectora; TD: terminalmente diferenciadas; MR: memoria residente. % células calculado sobre el total de linfocitos.

A continuación, estudiamos la producción intracelular de citoquinas por parte de los linfocitos T CD8 (Tabla 5.6). El número de células/ml de linfocitos T CD8 productores de IFN- γ , TNF- α y GM-CSF disminuía con la edad (Tabla 5.6). Por el contrario, el porcentaje de células CD8+ productoras de TNF- α aumentaba en los pacientes con EM (Tabla 5.6).

Tabla 5.6: correlaciones de la edad con los linfocitos T CD8 productores de citoquinas.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD8 IFN- γ	0,16	ns	-0,31	0,0002
Linfocitos T CD8 TNF- α	0,28	0,0008	-0,28	0,001
Linfocitos T CD8 IL-17	-0,03	ns	-0,22	ns
Linfocitos T CD8 GM-CSF	0,13	ns	-0,45	0,0006

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.2.3 Linfocitos B

Estudiamos los cambios relacionados con la edad que se producen en los linfocitos B. En primer lugar, encontramos un descenso, tanto en el porcentaje total de linfocitos B, como en el número de linfocitos B/ml (Figura 5.3).

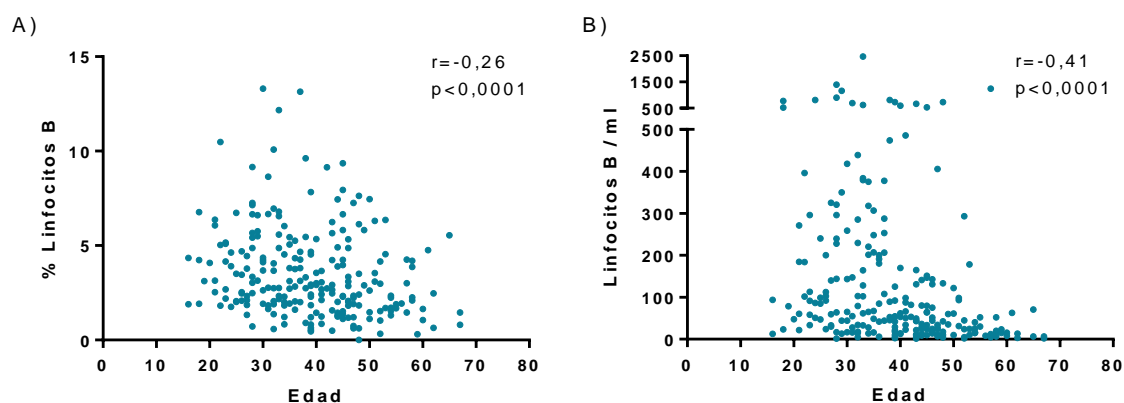


Figura 5.3: correlación de la edad con los linfocitos B presentes en el LCR de los pacientes con EM analizados en porcentaje sobre el total de linfocitos (A) y en número de células/ml (B).

Quisimos estudiar si dicha disminución podría asociarse con alguna subpoblación celular determinada. Inicialmente exploramos los distintos estados de activación celular B. Obtuvimos una correlación inversa de la edad con el número de células/ml de los linfocitos B naïve, de memoria y plasmablastos, aunque el descenso más acusado se produjo en el caso de los linfocitos B naïve (Tabla 5.7). Esto se observó también cuando estudiamos los porcentajes, ya que sólo el de los linfocitos B naïve disminuyó con la edad (Tabla 5.7)

Tabla 5.7: correlaciones de la edad con los estados madurativos del linfocito B.

	% células		Nº células/ml	
	r	p	r	p
Linfocitos B naïve	-0,45	<0,0001	-0,50	<0,0001
Plasmablastos	-0,24	ns	-0,33	0,0005
Linfocitos B memoria	-0,08	ns	-0,33	0,0005

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

Posteriormente, analizamos los cambios asociados a la edad en la respuesta T-dependiente y T-independiente. Para ello, estudiamos las subpoblaciones de linfocitos B CD5+ (respuesta T-independiente) y CD5- (respuesta T-dependiente) presentes en el LCR (Tabla 5.8). Tanto el número como el porcentaje de ambas subpoblaciones disminuyeron al aumentar la edad (Tabla 5.8), lo cual indicaría que tanto la respuesta T-independiente como la T-dependiente descienden con la edad en los pacientes con EM.

Tabla 5.8: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de linfocitos B CD5+ y CD5-.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos B CD5+	-0,31	<0,0001	-0,40	<0,0001
Linfocitos B CD5-	-0,22	0,002	-0,37	<0,0001

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

Por último, analizamos la producción intracelular de las citoquinas GM-CSF y TNF- α por parte de los linfocitos B y obtuvimos que únicamente el número de linfocitos B productores de TNF- α correlacionaba de forma inversa con la edad (Tabla 5.9).

Tabla 5.9: correlaciones de la edad con los linfocitos B productores de citoquinas.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos B TNF- α	-0,19	ns	-0,43	0,001
Linfocitos B GM-CSF	-0,01	ns	-0,33	ns

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.2.4 Células NK

Nos propusimos analizar la correlación de la edad con las células de la inmunidad innata presentes en el LCR de los pacientes con EM. Primeramente analizamos la correlación con las células NK, puesto que su número total de células/ml disminuyó en los pacientes con EM (Figura 5.4).

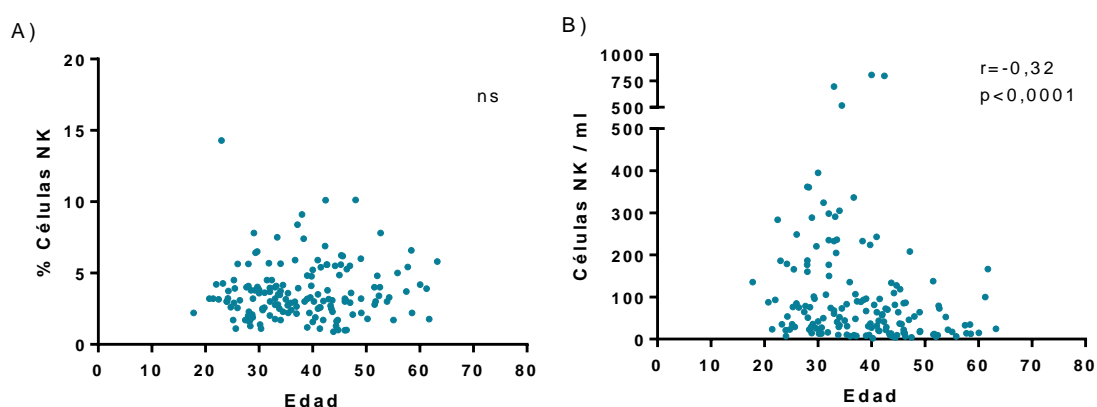


Figura 5.4: correlación de la edad con las células NK presentes en el LCR de los pacientes con EM analizados en porcentaje sobre el total de linfocitos (A) y en número de células/ml (B).

A continuación, estudiamos la asociación de la edad con las células CD56 *dim* CD3-, CD56 *bright* CD3- y NKT (Tabla 5.10). No hubo cambios significativos en los porcentajes (Tabla 5.10). Así, el descenso del número total de células NK/ml se debía por igual a todas las subpoblaciones estudiadas (Tabla 5.10).

Tabla 5.10: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de células NK presentes en el LCR de los pacientes con EM.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
NK CD56 <i>dim</i> CD3-	-0,06	ns	-0,28	0,0004
NK CD56 <i>bright</i> CD3-	0,06	ns	-0,27	0,0005
NKT	0,13	ns	-0,29	0,0003

r: coeficiente de correlación de Spearman. NK: *Natural Killer*; NKT: células T *Natural Killer*. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.2.5 Monocitos

El número de monocitos totales no se modificó significativamente con la edad en nuestro estudio, pero sí aumentó su porcentaje sobre el total de células mononucleares, lo cual se debía principalmente a la disminución del número de linfocitos (Figura 5.5).

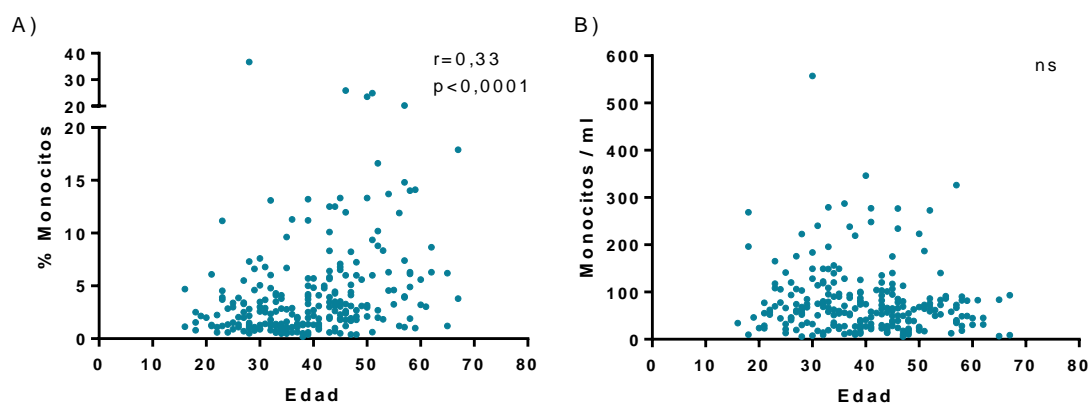


Figura 5.5: correlación de la edad con los monocitos presentes en el LCR de los pacientes con EM analizados en porcentaje sobre el total de células mononucleares (A) y en número de células/ml (B).

A continuación, quisimos estudiar más a fondo la activación de la respuesta innata en relación con la edad, para ello estudiamos distintas subpoblaciones de monocitos y la producción de citoquinas pro- y anti- inflamatorias por los mismos.

En primer lugar, analizamos las correlaciones entre la edad y las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. No obtuvimos ninguna asociación significativa ni en el número de células/ml ni en el porcentaje de estas poblaciones (Tabla 5.11).

Tabla 5.11: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de monocitos presentes en el LCR de los pacientes con EM.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Monocitos clásicos	0,09	ns	-0,07	ns
Monocitos intermedios	-0,01	ns	-0,05	ns
Monocitos no clásicos	-0,12	ns	-0,13	ns

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de monocitos.

Seguidamente, estudiamos la producción intracelular de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 por parte de los monocitos de LCR (Tabla 5.12).

Tabla 5.12: correlaciones de la edad con los monocitos productores de citoquinas en el LCR de los pacientes con EM.

	% células		Nº células/ml	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Monocitos IL-1 β	0,57	<0,0001	0,03	ns
Monocitos TNF- α	0,34	0,009	-0,07	ns
Monocitos IL-6	0,36	0,006	-0,10	ns
Monocitos IL-12	0,04	ns	-0,15	ns
Monocitos IL-10	0,21	ns	-0,18	ns

r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de monocitos.

El número de monocitos/ml productores de citoquinas no se modificó con la edad (Tabla 5.12). Sin embargo, los porcentajes de los monocitos productores de IL-1 β , TNF- α e IL-6 sí sufrieron cambios, ya que todos ellos se incrementaron en el grupo total de pacientes con EM (Tabla 5.12).

Así, nuestros datos sugieren que existe una disminución de la respuesta inmune adaptativa y una activación de la respuesta innata en relación con la edad en el SNC de los pacientes con EM.

5.3 ESTUDIO DE LA EDAD EN LA CUAL LOS CAMBIOS INMUNOLÓGICOS SE MANIFIESTAN CON CLARIDAD

Nos propusimos identificar el rango de edad en el cual se produce el cambio en la respuesta inmunológica que hemos observado en el SNC de los pacientes con EM. Para ello, elegimos la variable número de linfocitos en LCR, ya que mostraba una de las correlaciones más fuertes con la edad, y subdividimos a los pacientes en distintos períodos de edad (Figura 5.6). Comprobamos así que la mayor diferencia se produjo al pasar los 44 años (Figura 5.6).

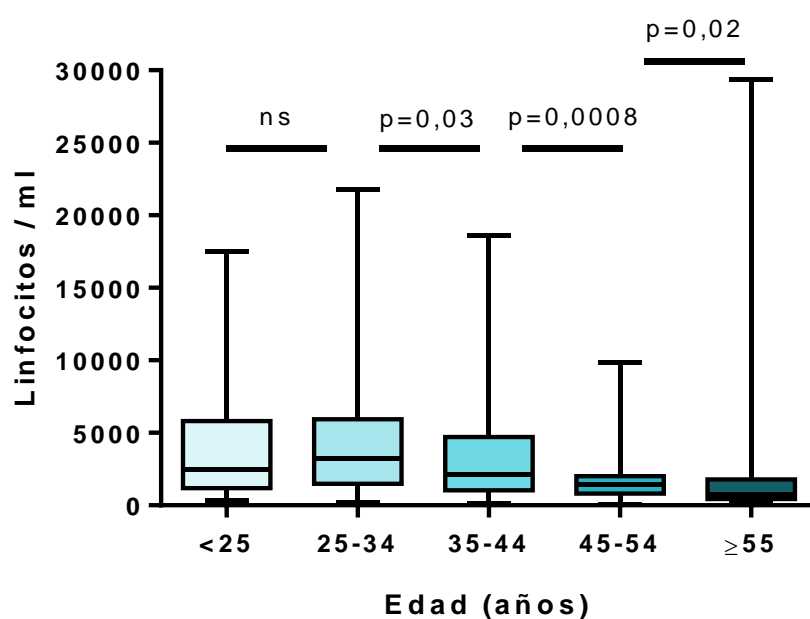


Figura 5.6: número de linfocitos/ml en LCR de los pacientes con esclerosis múltiple clasificados en distintos grupos de edad.

De este modo, establecimos la edad de 45 años como punto de corte para subclasificar a nuestros pacientes (Figura 5.7).

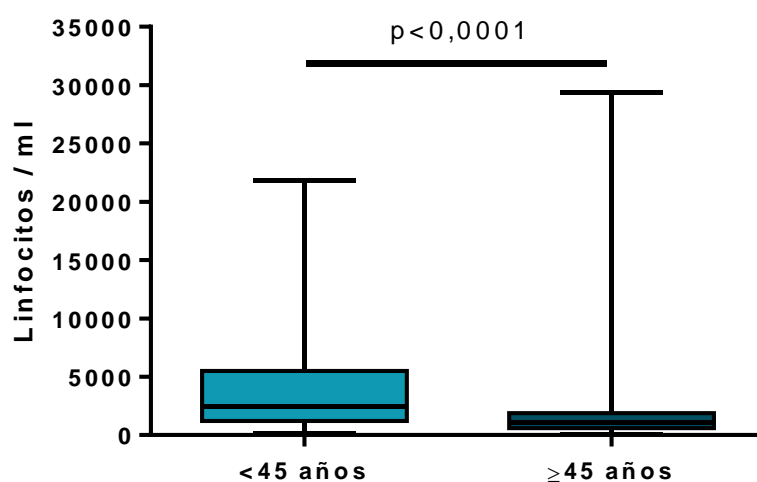


Figura 5.7: comparación del número de linfocitos/ml en LCR en pacientes mayores y menores de 45 años.

5.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LAS BOCM-LE

Nuestro siguiente propósito fue analizar si el estado inmunológico de los pacientes podría influir en los cambios asociados a la edad. Para ello, investigamos la presencia de BOCM-LE, un marcador asociado con una mayor respuesta inflamatoria en el SNC de los pacientes con EM, en todos los pacientes incluidos en el estudio. A continuación, subdividimos a los pacientes en función de la presencia (n=72) o ausencia (n=192) de BOCM-LE (Tabla 5.13) y exploramos los cambios asociados a la edad en ambos grupos.

Tabla 5.13: características clínicas y demográficas de los pacientes clasificados en función de la presencia o ausencia de BOCM-LE.

	BOCM-LE+ (n=72)	BOCM-LE- (n=192)	p
Sexo (Femenino/Masculino)	38/34	112/80	ns
Edad (años) (M±DS)	37,15±9,87	40,16±11,35	ns
Meses de evolución (M±DS)	21,64±37,61	44,66±86,69	ns
BOCG (pos/neg)	70/2	171/21	0,04
EMRR/EMSP/EMPP	60/0/12	174/2/16	ns
EDSS (M±DS)	2,28±1,51	1,87±1,31	0,005
MSSS (M±DS)	6,05±2,46	3,87±2,30	<0,0001
Lesiones en T2 (M±DS)	24,86±17,67	22,70±20,73	ns
Lesiones captantes (M±DS)	2,48±4,98	1,02±2,16	ns

BOCG: bandas oligoclonales de IgG, BOCM: BOC de IgM; BOCM-LE: BOC de IgM lípido específicas; M: media; DS: desviación estándar; pos: positivo; neg: negativo.

Observamos que la bajada asociada a la edad de las células mononucleares del LCR, que hemos descrito previamente, se relacionaba con la ausencia de BOCM-LE (Figura 5.8).

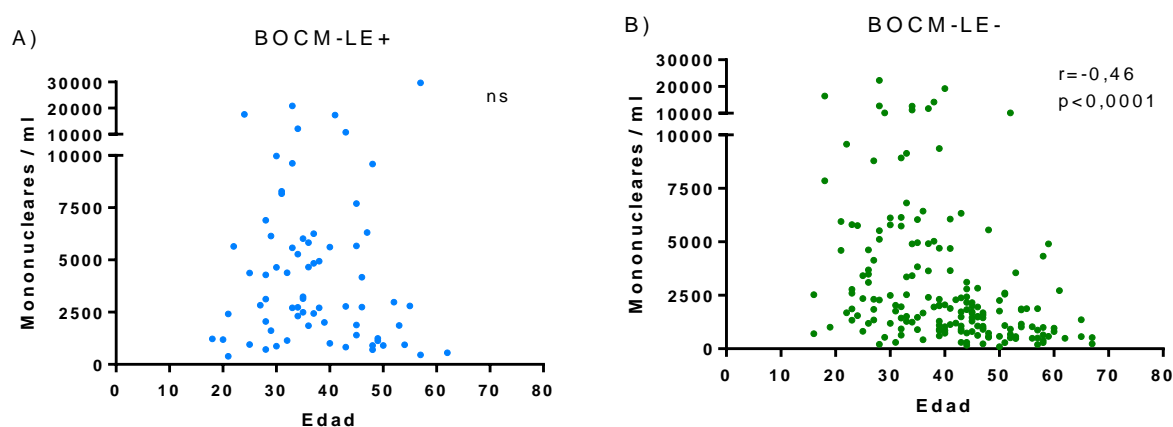


Figura 5.8: correlaciones de la edad con el número de células mononucleares en el grupo de pacientes BOCM-LE+ (A) y el grupo de pacientes BOCM-LE- (B).

Además, cuando separamos a los pacientes en función del punto de corte de la edad previamente establecido (45 años), observamos que los pacientes BOCM-LE+, presentaban un mayor número de células mononucleares/ml que los pacientes BOCM-LE- en todas las franjas de edad analizadas (Figura 5.9). Sin embargo, el dato más relevante fue el acusado descenso de las células mononucleares en el grupo BOCM-LE- mayor de 45 años con respecto a los pacientes BOCM-LE- menores de 45 años (Figura 5.9).

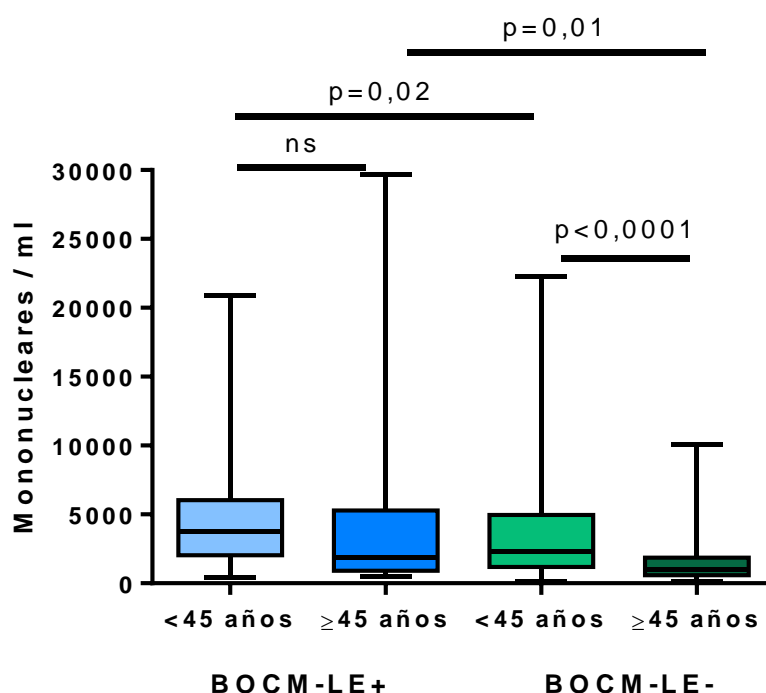


Figura 5.9: comparación del número de células mononucleares/ml en relación a la presencia o ausencia de BOCM-LE y a la edad.

Estos resultados indicarían que el perfil inmunológico podría influir en los cambios relacionados con la edad de las poblaciones leucocitarias presentes en el LCR. En vista de dichos resultados, decidimos explorar el resto de poblaciones celulares previamente estudiadas. Así, en primer lugar analizamos los cambios asociados a la edad en linfocitos y monocitos, estudiando tanto el número de células/ml, como el porcentaje calculado con respecto a las células mononucleares (Figura 5.10).

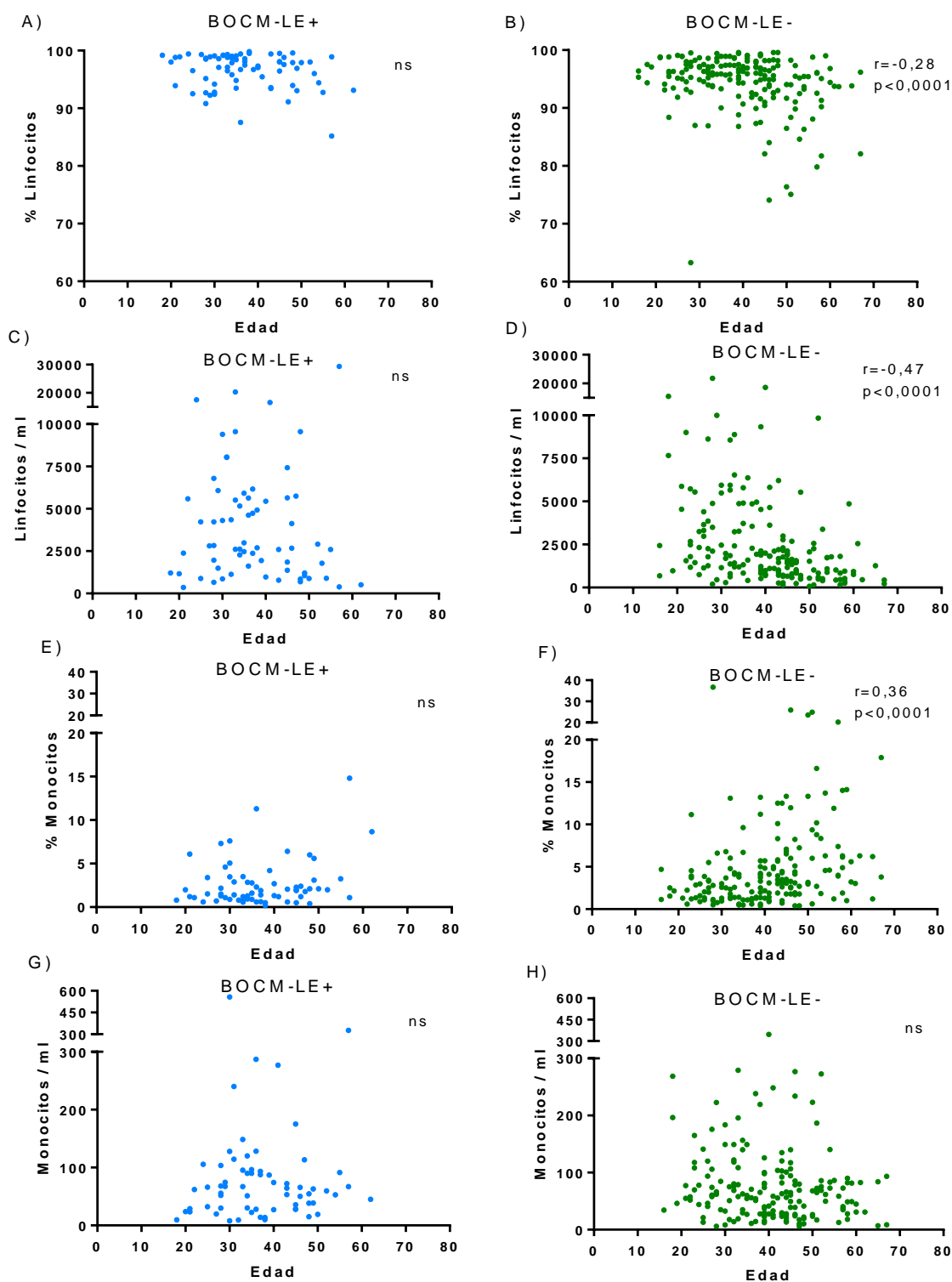


Figura 5.10: correlaciones de la edad con el porcentaje y el número de linfocitos y monocitos.

Porcentaje de linfocitos en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B). Número de linfocitos en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D). Porcentaje de monocitos en pacientes BOCM-LE+ (E) y pacientes BOCM-LE- (F). Número de monocitos en los grupos BOCM-LE+ (G) y BOCM-LE- (H).

Obtuvimos que el descenso del porcentaje y el número de células/ml de los linfocitos se debía al grupo de pacientes BOCM-LE-; al igual que el incremento en el porcentaje de monocitos (Figura 5.10).

El porcentaje de células NK no se modificó con la edad, pero su número de células/ml también disminuyó exclusivamente en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.11).

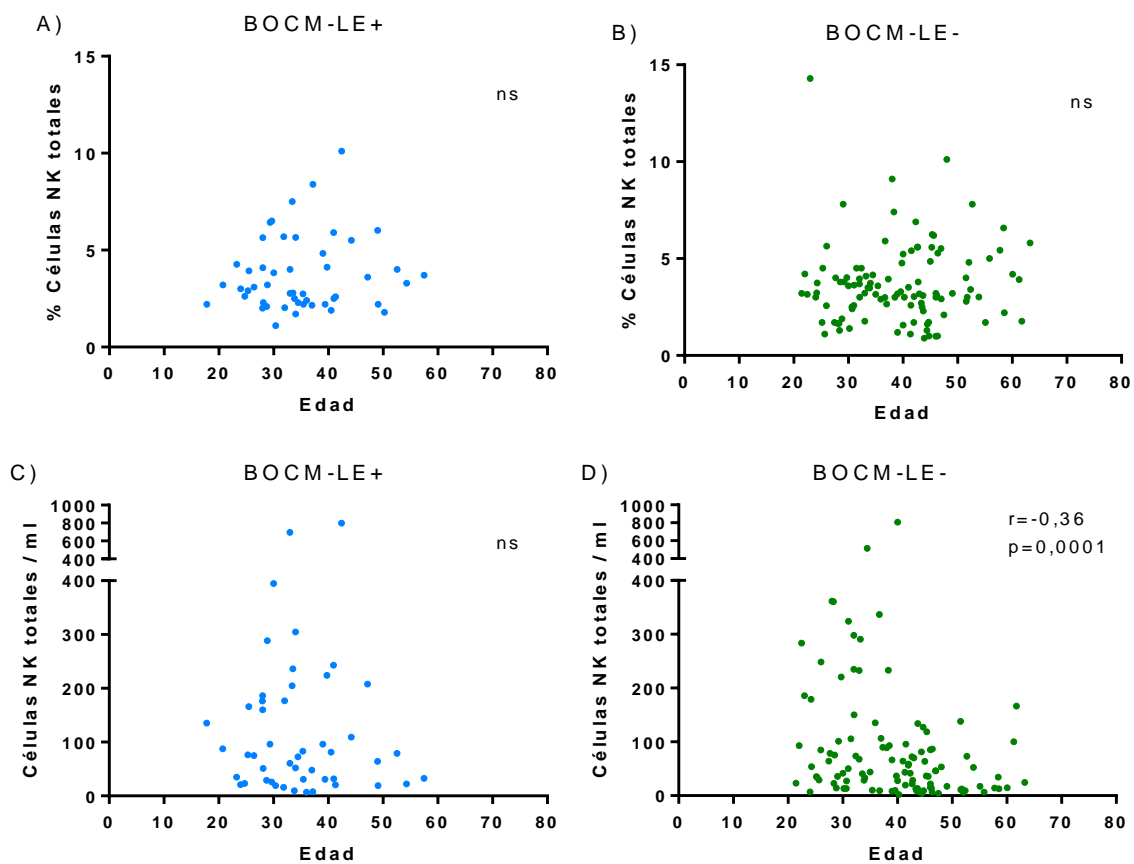


Figura 5.11: correlaciones de la edad con el porcentaje de células NK en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B) y con el número de células NK en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D).

5.4.1 Linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4 disminuyeron con la edad en número de células/ml, pero dicho descenso fue significativo únicamente en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.12)

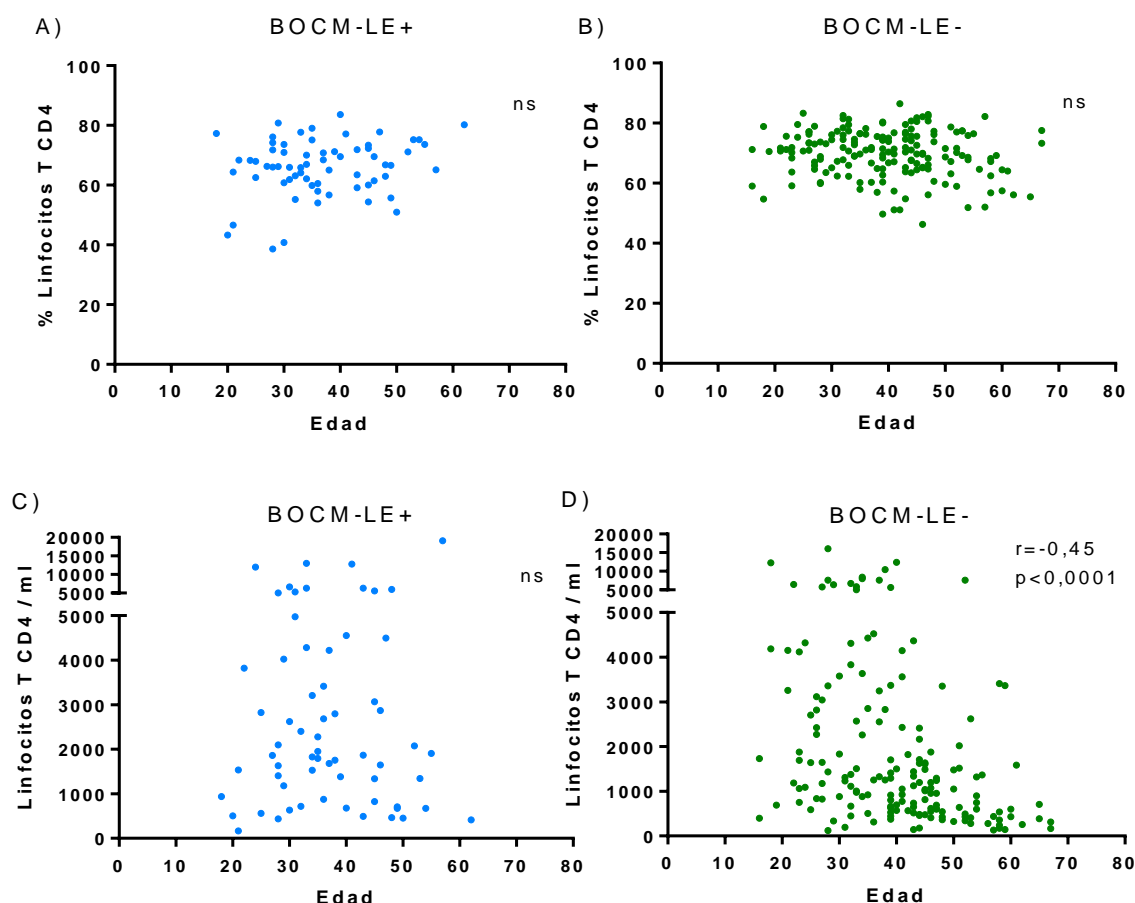


Figura 5.12: correlaciones entre la edad y el porcentaje de linfocitos T CD4 en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B) y el número de linfocitos T CD4 en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D).

Además, este descenso del número de células/ml estuvo acompañado por la disminución de todas las subpoblaciones de linfocitos T CD4 analizadas en el grupo BOCM-LE- y por el descenso de la producción intracelular de citoquinas, también en los pacientes BOCM-LE- (Tabla 5.14).

Tabla 5.14: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y su producción intracelular de citoquinas en función de las BOCM-LE.

	% células				Nº células/ml			
	BOCM-LE+		BOCM-LE-		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD4 naïve	0,03	ns	-0,19	ns	-0,23	ns	-0,41	<0,0001
Linfocitos T CD4 MC	-0,24	ns	-0,10	ns	-0,29	ns	-0,39	<0,0001
Linfocitos T CD4 ME	0,12	ns	-0,15	ns	-0,08	ns	-0,51	<0,0001
Linfocitos T CD4 TD	0,46	ns	0,05	ns	0,09	ns	-0,29	0,005
Linfocitos T CD4 efectores	0,44	ns	0,02	ns	0,11	ns	-0,47	<0,0001
Linfocitos T CD4 reguladores	0,13	ns	-0,03	ns	0,06	ns	-0,33	<0,0001
Linfocitos T CD4 IFN- γ	0,10	ns	0,07	ns	-0,16	ns	-0,33	0,0006
Linfocitos T CD4 TNF- α	0,16	ns	-0,02	ns	-0,14	ns	-0,36	0,0002
Linfocitos T CD4 IL-17	-0,14	ns	-0,08	ns	-0,35	ns	-0,32	0,001
Linfocitos T CD4 GM-CSF	0,56	ns	-0,09	ns	0,28	ns	-0,44	0,003

BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM líquido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; MC: memoria central; ME: memoria efectora; TD: terminalmente diferenciadas. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.4.2 Linfocitos T CD8

Los linfocitos T CD8 también vieron disminuido su número de células/ml exclusivamente en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.13).

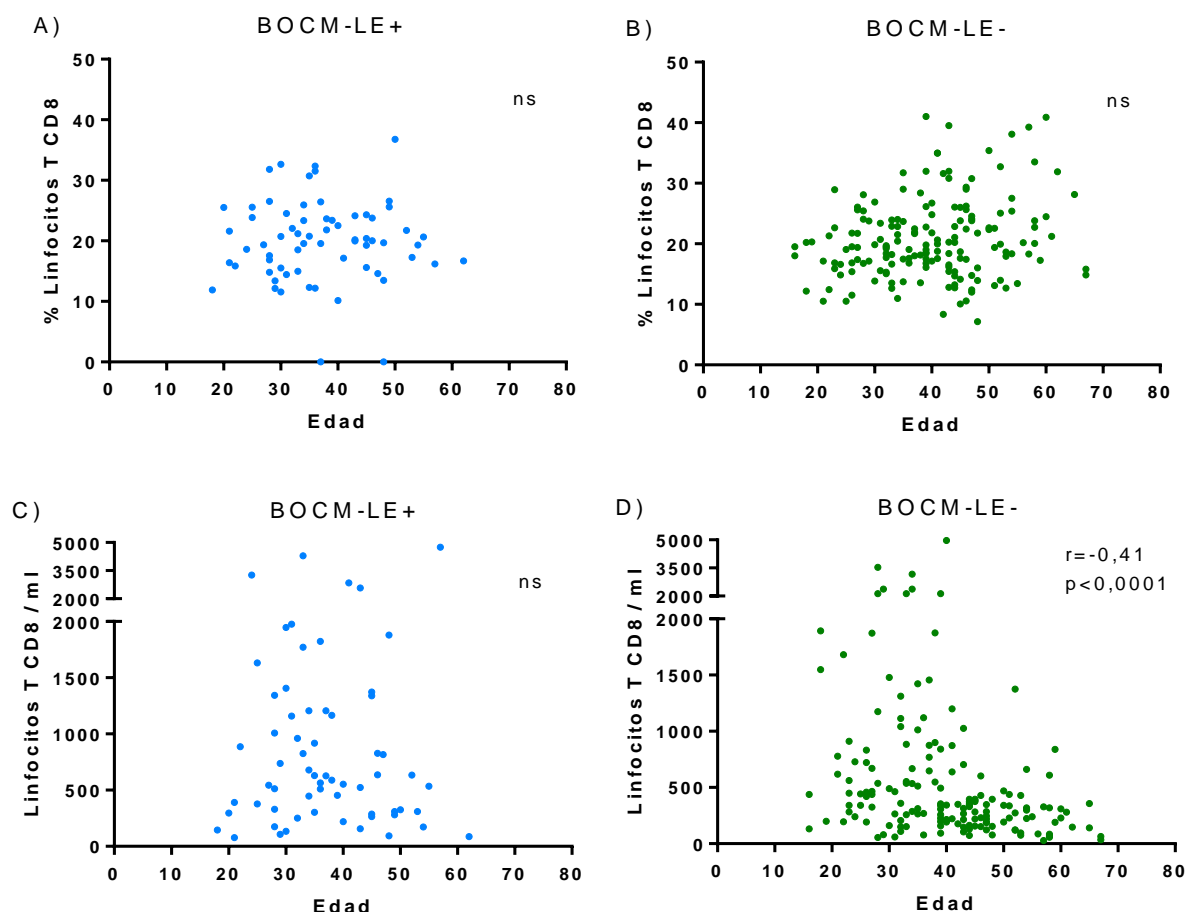


Figura 5.13: correlaciones entre la edad y el porcentaje de linfocitos T CD8 en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B) y el número de linfocitos T CD8 en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D).

Sin embargo, no todas las poblaciones de linfocitos T CD8 disminuyeron en número de células/ml en el grupo de BOCM-LE-, ya que la población MR no mostró una correlación significativa en este grupo (Tabla 5.15). De hecho, esta fue la única subpoblación dentro de la respuesta adaptativa que incrementó su porcentaje con la edad en los pacientes con EM y específicamente en el grupo BOCM-LE- (Tabla 5.15). Esto podría sugerir que el papel desempeñado por estas células al aumentar la edad en la protección frente a los patógenos sería más relevante en los pacientes BOCM-LE-, en

comparación con los pacientes BOCM-LE+. En la Figura 4.14 se muestran ejemplos representativos de esta subpoblación en pacientes menores y mayores de 45 años.

Tabla 5.15: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de linfocitos T CD8 y su producción intracelular de citoquinas en función de las BOCM-LE.

	% células				Nº células/ml			
	BOCM-LE+		BOCM-LE-		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD8 naïve	-0,23	ns	-0,02	ns	-0,38	ns	-0,41	<0,0001
Linfocitos T CD8 MC	-0,24	ns	-0,02	ns	-0,35	ns	-0,37	0,0003
Linfocitos T CD8 ME	-0,17	ns	0,08	ns	-0,24	ns	-0,36	0,0004
Linfocitos T CD8 TD	0,12	ns	0,07	ns	-0,22	ns	-0,41	<0,0001
Linfocitos T CD8 efectores	-0,11	ns	0,19	ns	-0,24	ns	-0,40	<0,0001
Linfocitos T CD8 MR	0,12	ns	0,36	0,003	-0,28	ns	-0,13	ns
Linfocitos T CD8 IFN- γ	0,13	ns	0,16	ns	-0,11	ns	-0,33	0,0006
Linfocitos T CD8 TNF- α	0,28	ns	0,28	0,005	-0,09	ns	-0,30	0,002
Linfocitos T CD8 IL-17	-0,26	ns	0,04	ns	-0,24	ns	-0,16	ns
Linfocitos T CD8 GM-CSF	0,54	ns	0,05	ns	0,23	ns	-0,51	0,0005

BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM líquido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; MC: memoria central; ME: memoria efectora; TD: terminalmente diferenciadas; MR: memoria residente. % células calculado sobre el total de linfocitos.

En cuanto a la producción de citoquinas por parte de los linfocitos T CD8 (Tabla 5.15), disminuyó el número de células productoras de IFN- γ , TNF- α y GM-CSF en el grupo sin BOCM-LE; pero aumentó el porcentaje de linfocitos T CD8 productores de TNF- α también en dicho grupo BOCM-LE-.

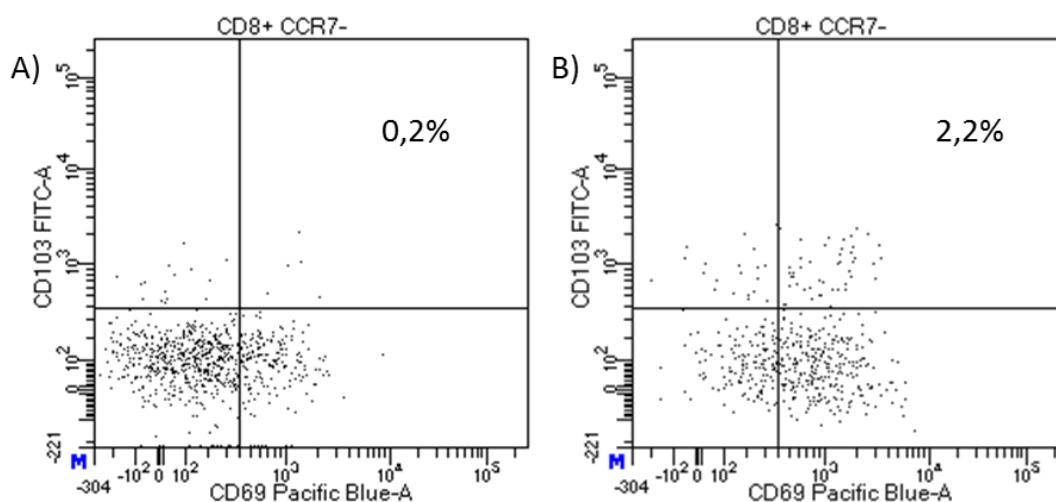


Figura 5.14: linfocitos T de memoria residente (CD8+ CCR7- CD69+ CD103+) en los pacientes menores (A) y mayores (B) de 45 años. % calculado sobre el total de linfocitos

5.4.3 Linfocitos B

Tanto el porcentaje como el número de linfocitos B totales correlacionaban de forma inversa con la edad en los pacientes con EM, pero al dividir en función de las BOCM-LE esto se observaba únicamente en los pacientes BOCM-LE- (Figura 5.15). La Figura 5.16 muestra ejemplos representativos de linfocitos B en pacientes BOCM-LE- menores y mayores de 45 años.

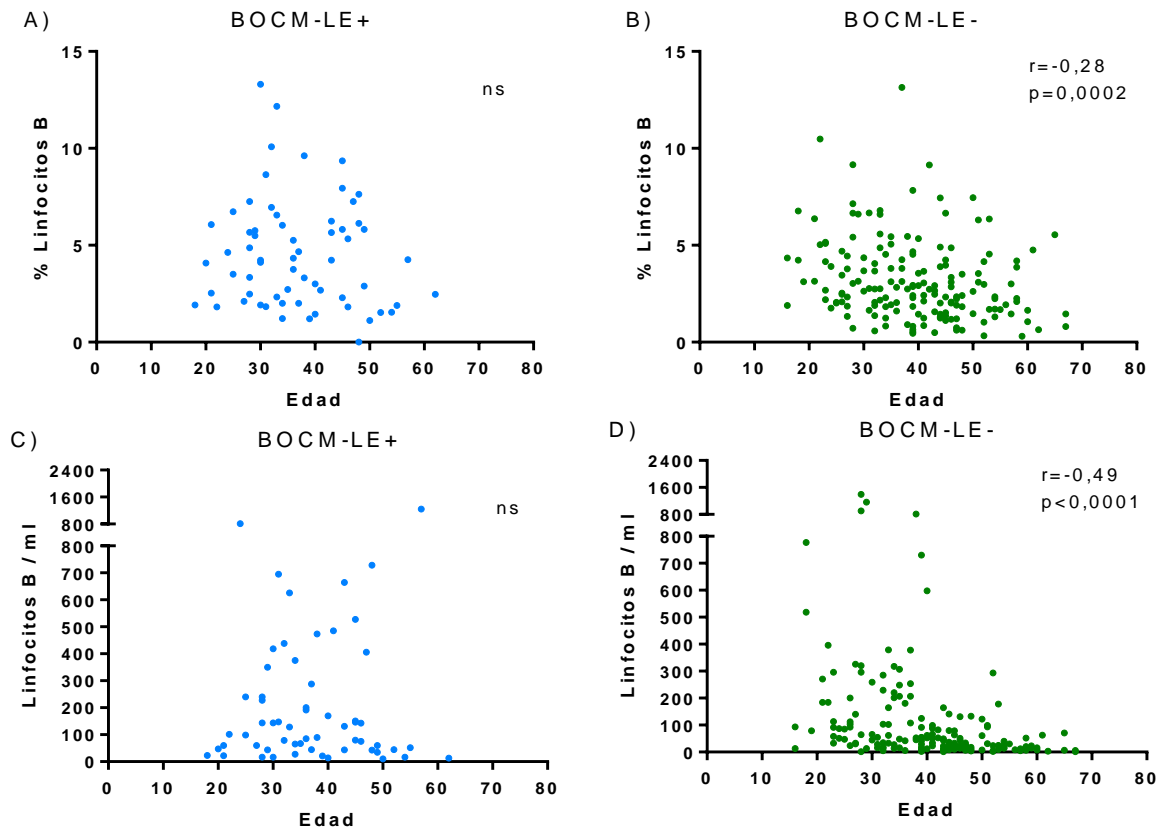


Figura 5.15: correlaciones entre la edad y el porcentaje de linfocitos B en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B) y el número de linfocitos B en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D).

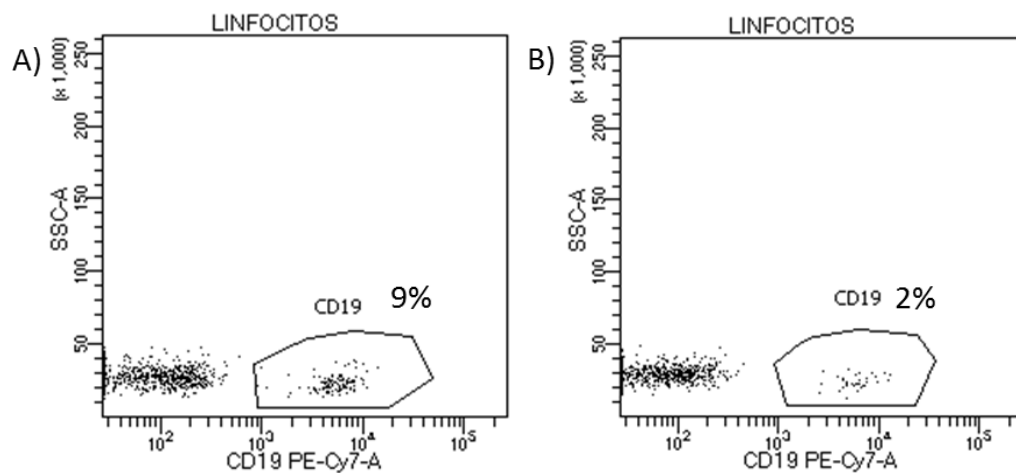


Figura 5.16: linfocitos B (CD19+) en los pacientes BOCM-LE- menores (A) y mayores (B) de 45 años. % celular calculado sobre el total de linfocitos.

Al analizar el descenso de los diferentes estados de maduración de los linfocitos B, obtuvimos que este se debía también a la población BOCM-LE- y que se acompañaba de un descenso en el porcentaje de células B naïve también en dicha población (Tabla 5.16).

Tabla 5.16: correlaciones de la edad con los estados de maduración B en función de las BOCM-LE.

	% células				Nº células/ml			
	BOCM-LE+		BOCM-LE-		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
B naïve	-0,33	ns	-0,49	<0,0001	-0,37	ns	-0,53	<0,0001
Plasmablastos	-0,46	ns	-0,19	ns	-0,34	ns	-0,33	0,002
B memoria	-0,16	ns	-0,09	ns	-0,22	ns	-0,38	0,0004

BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM líquido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de linfocitos.

El estudio de las respuestas T-dependientes e independientes mostró que ambas disminuían al aumentar la edad en los pacientes con EM, pero que dicho descenso sólo era significativo en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.17)

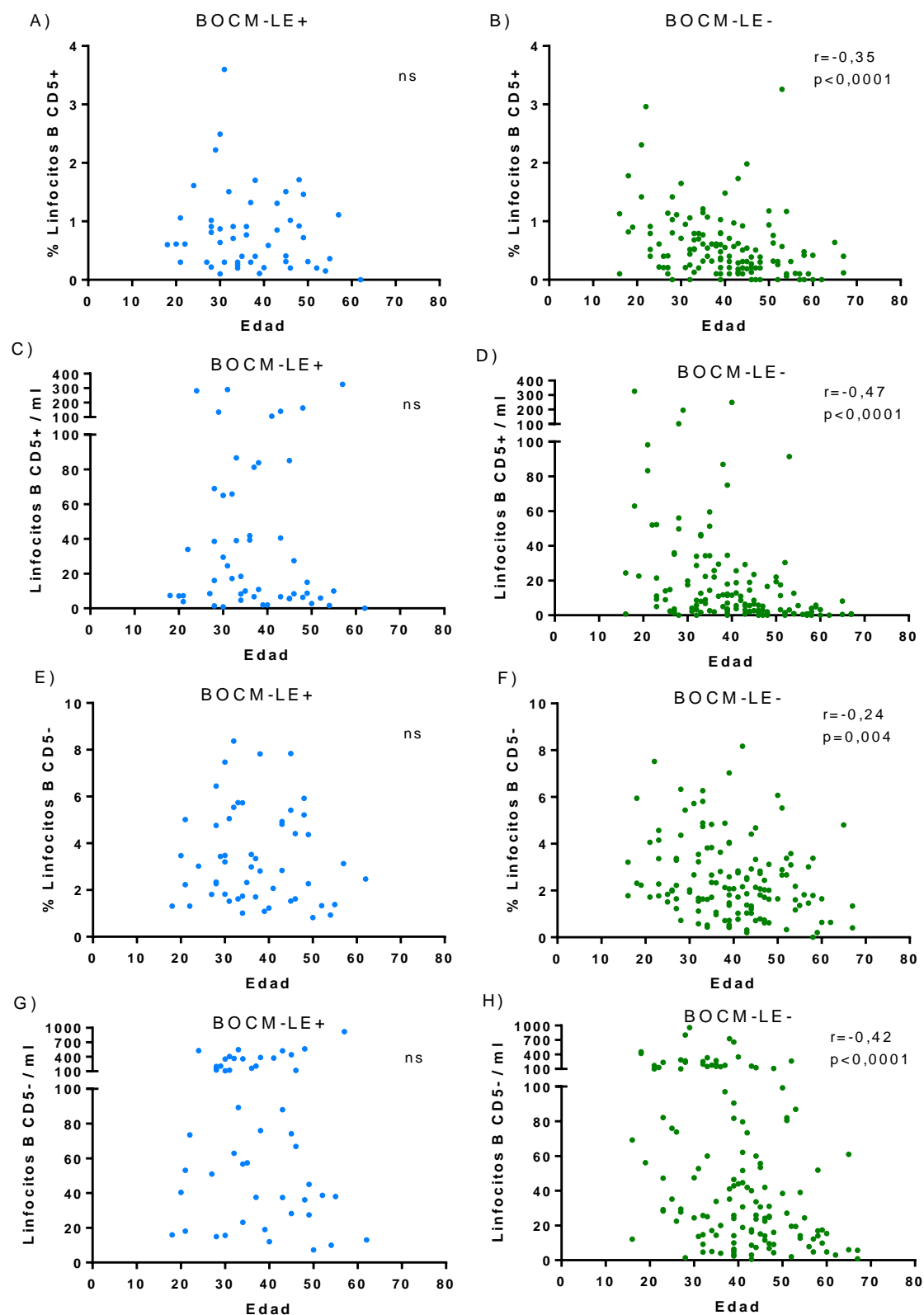


Figura 5.17: correlaciones entre la edad y el porcentaje de linfocitos B CD5+ y CD5- en pacientes BOCM-LE+ (A, E) y pacientes BOCM-LE- (B, F) y el número de linfocitos B CD5+ y CD5- en los grupos BOCM-LE+ (C, G) y BOCM-LE- (D, H).

Por último, la producción intracelular de GM-CSF por parte de los linfocitos B no mostró ninguna correlación significativa en ninguno de los dos grupos. Sin embargo, la producción de TNF- α /ml mostró una correlación inversa con la edad tanto en los pacientes BOCM-LE+ como en los pacientes BOCM-LE-, siendo la correlación más fuerte aquella encontrada en el grupo BOCM-LE+ (Figura 5.18).

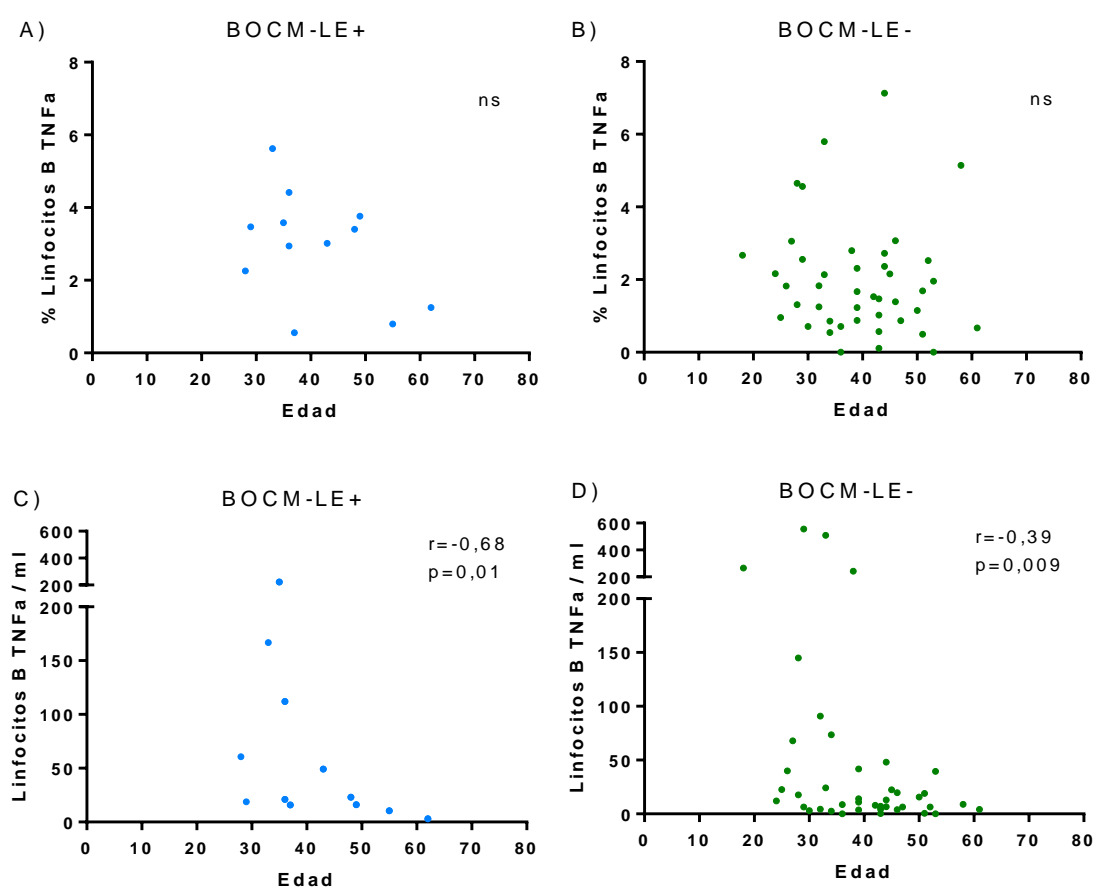


Figura 5.18: correlaciones entre la edad y el porcentaje de linfocitos B productores de TNF- α en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B) y el número de linfocitos B productores de TNF- α en los grupos BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D).

La Figura 5.19 muestra ejemplos representativos de los linfocitos B productores de TNF- α en pacientes menores y mayores de 45 años.

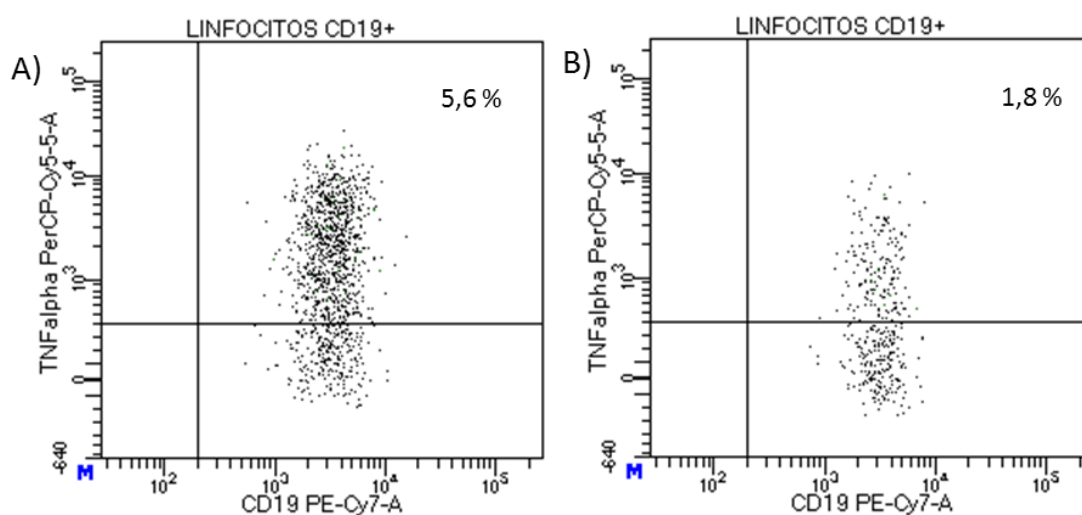


Figura 5.19: linfocitos B productores de TNF- α en los pacientes menores (A) y mayores (B) de 45 años. % celular calculado sobre el total de linfocitos.

5.4.4 Células NK

El descenso del número de células NK/ml relacionado con la edad se acompañó de un descenso similar de todas sus subpoblaciones estudiadas únicamente en el grupo BOCM-LE- (Tabla 5.17).

Tabla 5.17: correlaciones de la edad con las subpoblaciones de células NK en función de las BOCM-LE.

	% células				Nº células/ml			
	BOCM-LE+		BOCM-LE-		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
NK CD56 <i>dim</i> CD3-	-0,08	ns	-0,06	ns	-0,15	ns	-0,30	0,001
NK CD56 <i>bright</i> CD3-	-0,02	ns	0,12	ns	-0,09	ns	-0,29	0,002
NKT	-0,01	ns	0,16	ns	-0,13	ns	-0,32	0,0006

BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; NK: *Natural Killer*; NKT: células T *Natural Killer*. % células calculado sobre el total de linfocitos.

5.4.5 Monocitos

En nuestro estudio, el porcentaje de monocitos se incrementó con la edad en los pacientes con EM y dicho incremento únicamente fue significativo en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.10). No obtuvimos ninguna correlación significativa al explorar las subpoblaciones de monocitos. Sin embargo, sí obtuvimos diferencias al analizar la producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos en función de las BOCM-LE (Tabla 5.18).

Tabla 5.18: correlaciones de la edad con la producción intracelular de citoquinas por parte de los monocitos en función de las BOCM-LE.

	% células				Nº células/ml			
	BOCM-LE+		BOCM-LE-		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Monocitos IL-1 β	0,76	0,001	0,51	0,0005	0,35	ns	-0,10	ns
Monocitos TNF- α	0,75	0,002	0,25	ns	0,21	ns	-0,18	ns
Monocitos IL-6	-0,02	ns	0,46	0,002	-0,14	ns	-0,12	ns
Monocitos IL-12	-0,13	ns	0,12	ns	-0,23	ns	-0,14	ns
Monocitos IL-10	0,27	ns	0,24	ns	-0,12	ns	-0,20	ns

BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de monocitos.

No observamos ninguna correlación significativa con el número de células productoras de citoquinas /ml (Tabla 5.18). Sin embargo, obtuvimos un incremento en la proporción de síntesis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Tabla 5.18) (Figura 5.20). La producción de IL-1 β se incrementó con la edad tanto en el grupo BOCM-LE-, como en el grupo BOCM-LE+, aunque dicho incremento fue más acusado en este último (Figura 5.20). Por su parte, la producción de TNF- α sólo se incrementó con la edad en los pacientes BOCM-LE+; mientras que la producción de IL-6 únicamente aumentó en los pacientes sin BOCM-LE (Figura 5.20). Esto indicaría un diferente patrón de activación de la respuesta innata relacionada con la edad según el perfil inmunológico. En la Figura

5.21 se muestran ejemplos representativos de los monocitos productores de citoquinas en pacientes menores y mayores de 45 años.

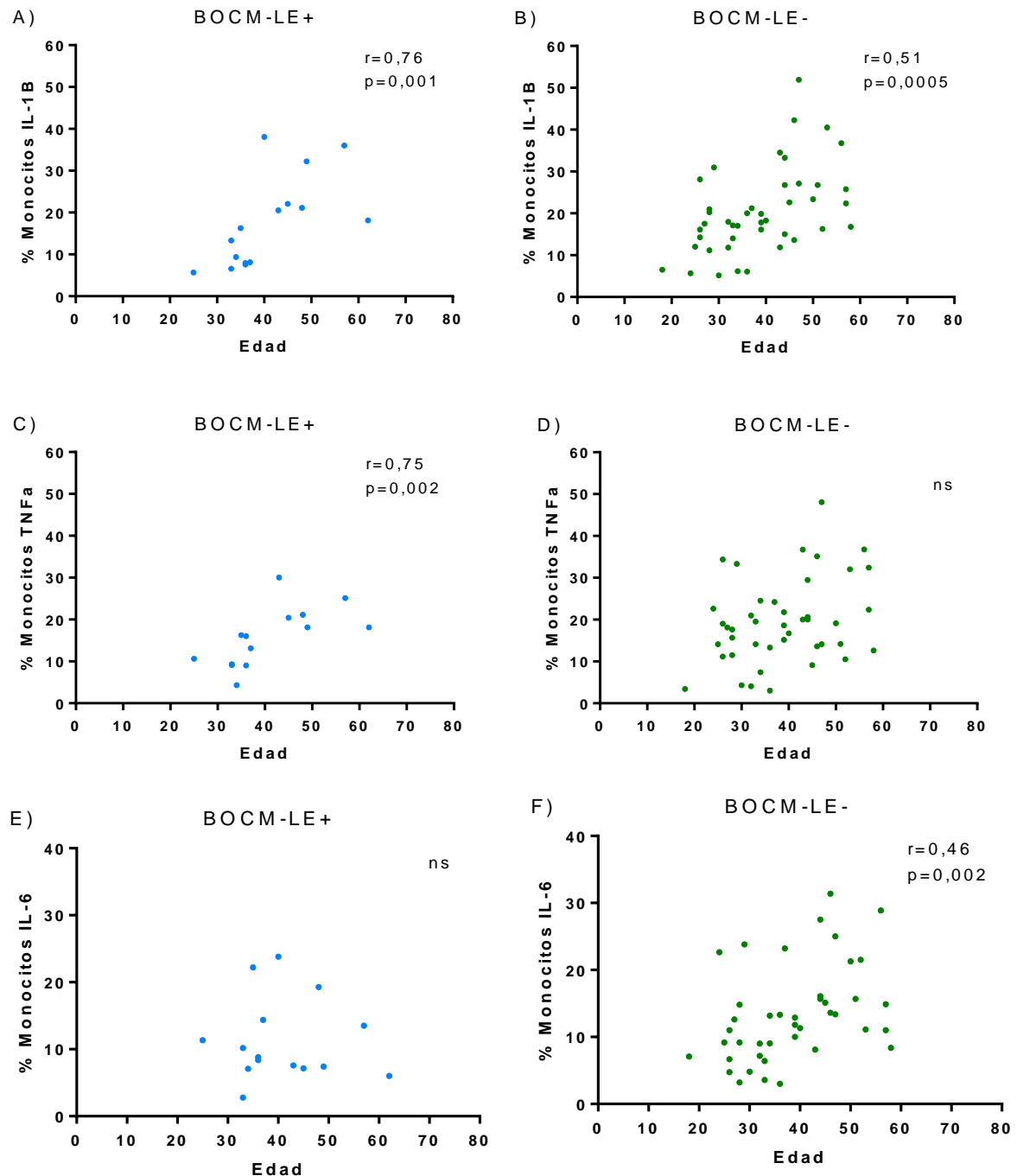


Figura 5.20: correlaciones de la edad con el porcentaje de monocitos productores de citoquinas. IL-1 β en pacientes BOCM-LE+ (A) y pacientes BOCM-LE- (B). TNF- α en pacientes BOCM-LE+ (C) y BOCM-LE- (D). IL-6 en pacientes BOCM-LE+ (E) y pacientes BOCM-LE- (F).

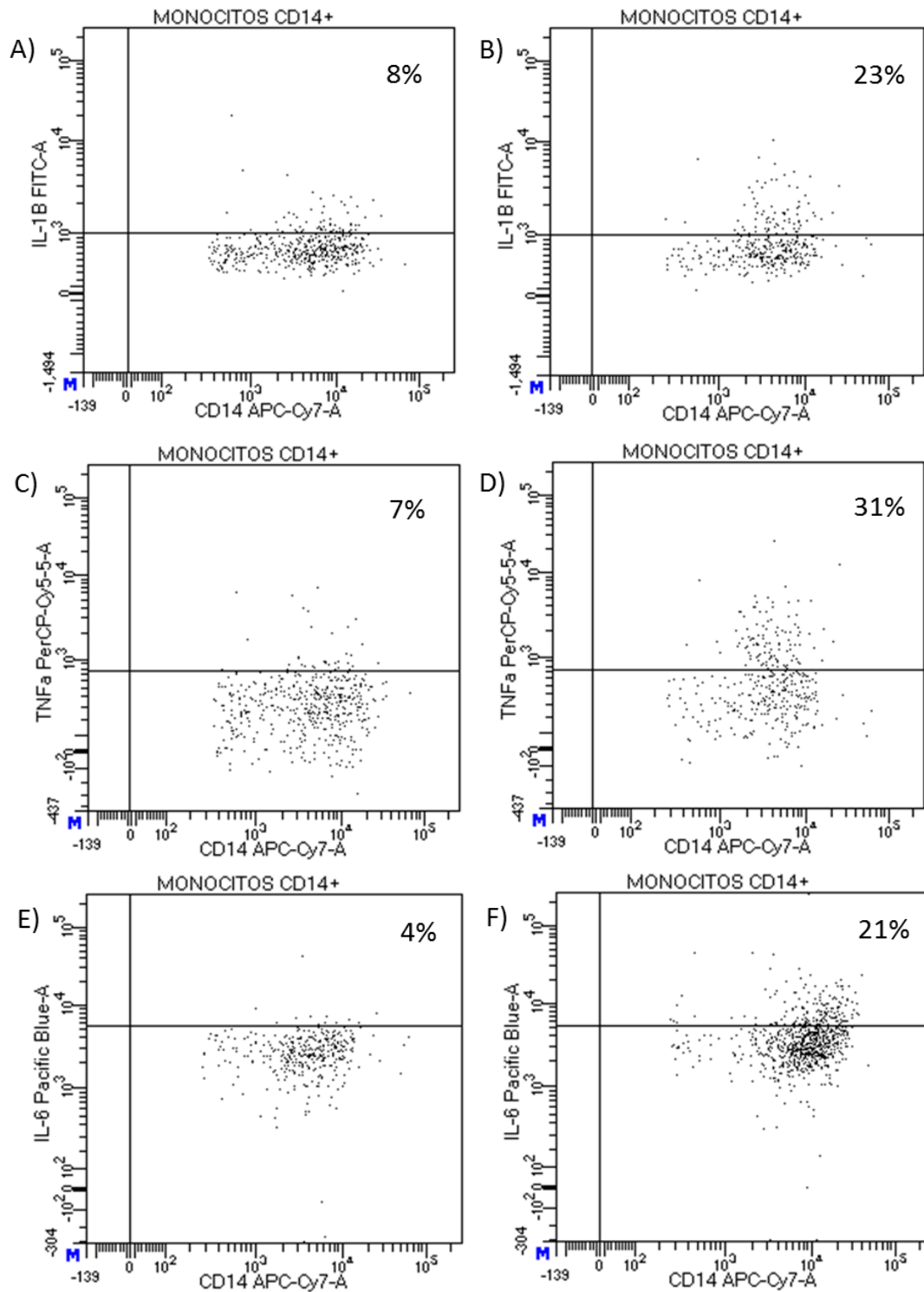


Figura 5.21: monocitos productores de citoquinas de pacientes menores y mayores de 45 años. (A) IL-1 β en paciente menor de 45 años, (B) IL-1 β en paciente mayor de 45 años, (C) TNF- α en paciente menor de 45 años, (D) TNF- α en paciente mayor de 45 años, (E) IL-6 en paciente menor de 45 años y (F) IL-6 en paciente mayor de 45 años. % calculado sobre el total de monocitos.

5.4.6 Clasificación en mayores y menores de 45 años

A continuación, exploramos las posibles diferencias existentes al clasificar a los pacientes en mayores y menores de 45 años. Para ello, elegimos las principales poblaciones leucocitarias presentes en el LCR o aquellas que mostraban una mayor significación estadística en los análisis realizados previamente. En primer lugar, analizamos los números de células/ml de linfocitos y monocitos (Figura 5.22).

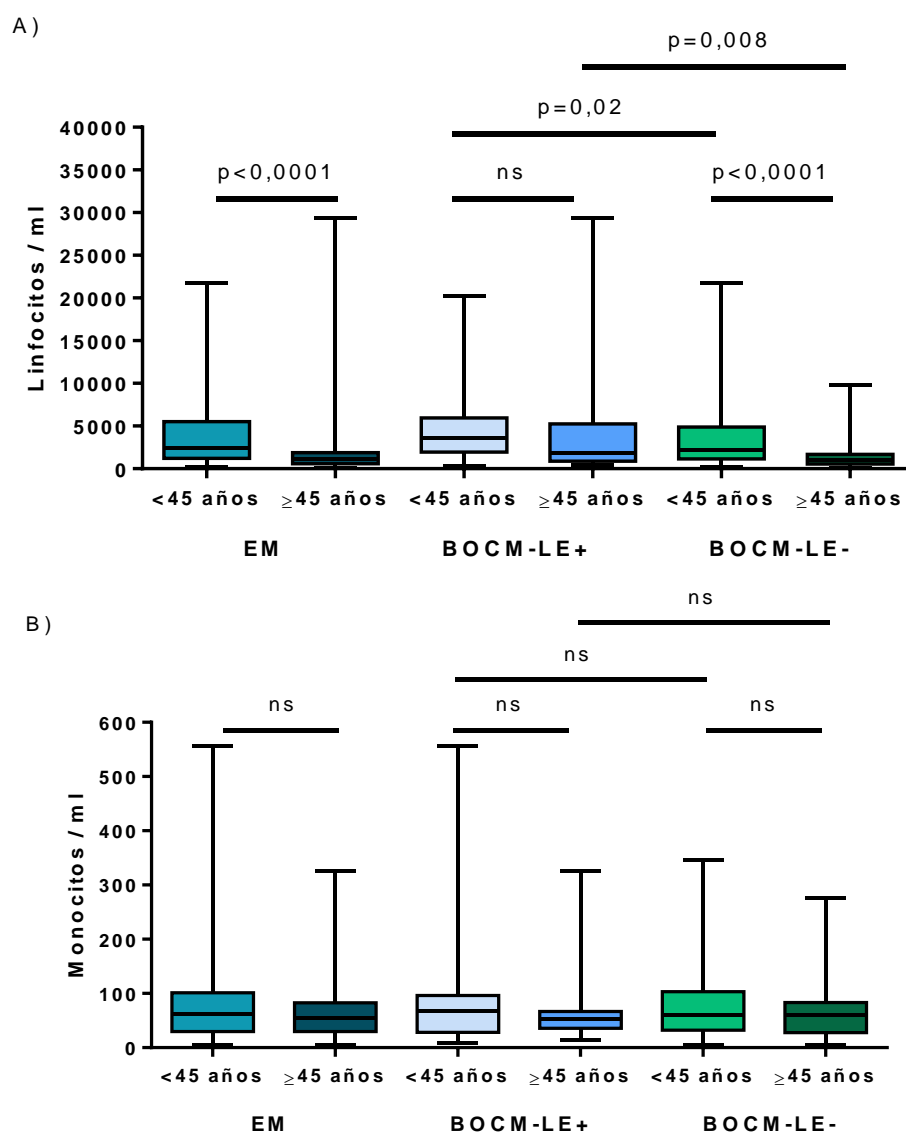


Figura 5.22: comparaciones del número de células/ml de linfocitos (A) y monocitos (B) en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

No obtuvimos ninguna diferencia significativa en el número de monocitos/ml (Figura 5.22 B). Por su parte, el número de linfocitos/ml era inferior en los pacientes con EM mayores de 45 años; pero este descenso sólo era significativo en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.22 A). Además, los pacientes BOCM-LE+ mostraban un mayor número de linfocitos/ml que los pacientes BOCM-LE- en las dos franjas de edad analizadas (Figura 5.22 A).

En cuanto a las células NK/ml, los pacientes menores de 45 años tenían una cantidad más elevada de dichas células que los pacientes mayores, tanto en el grupo completo, como subdividiendo en función de las BOCM-LE (Figura 5.23). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los pacientes BOCM-LE+ y los pacientes BOCM-LE- (Figura 5.23).

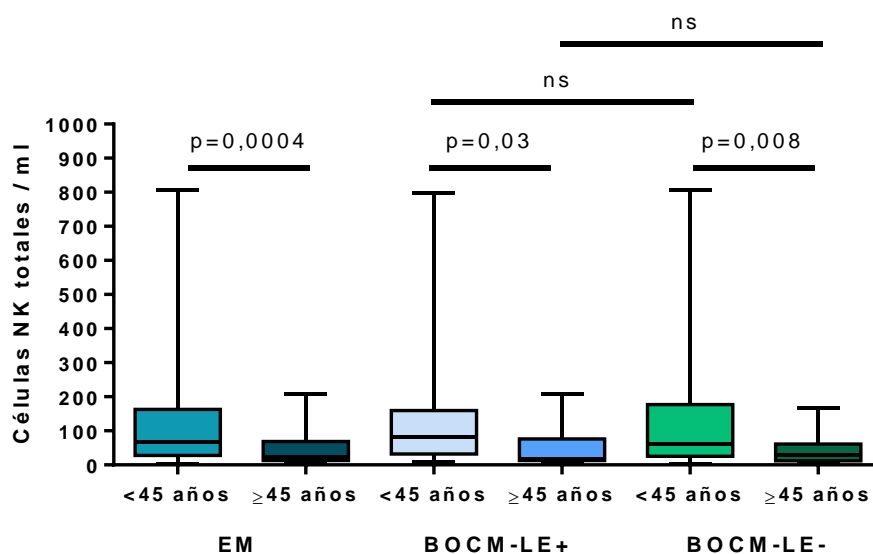


Figura 5.23: comparación del número de células NK/ml en función de la edad y las BOCM-LE.

EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

En el análisis del número de células/ml de los linfocitos T CD4 y CD8, observamos un mayor número de ambos tipos de linfocitos en los pacientes menores de 45 años (Figura 5.24). Sin embargo, estas diferencias sólo fueron significativas en el

grupo BOCM-LE- (Figura 5.24). Además, los pacientes BOCM-LE+ mayores de 45 años mostraron un mayor número de linfocitos T CD4/ml que los pacientes BOCM-LE- mayores de 45 años (Figura 5.24 A). En el caso de los linfocitos T CD8, los pacientes BOCM-LE+ mostraron un mayor número de células/ml que los pacientes BOCM-LE- en ambos grupos de edad (Figura 5.24 B).

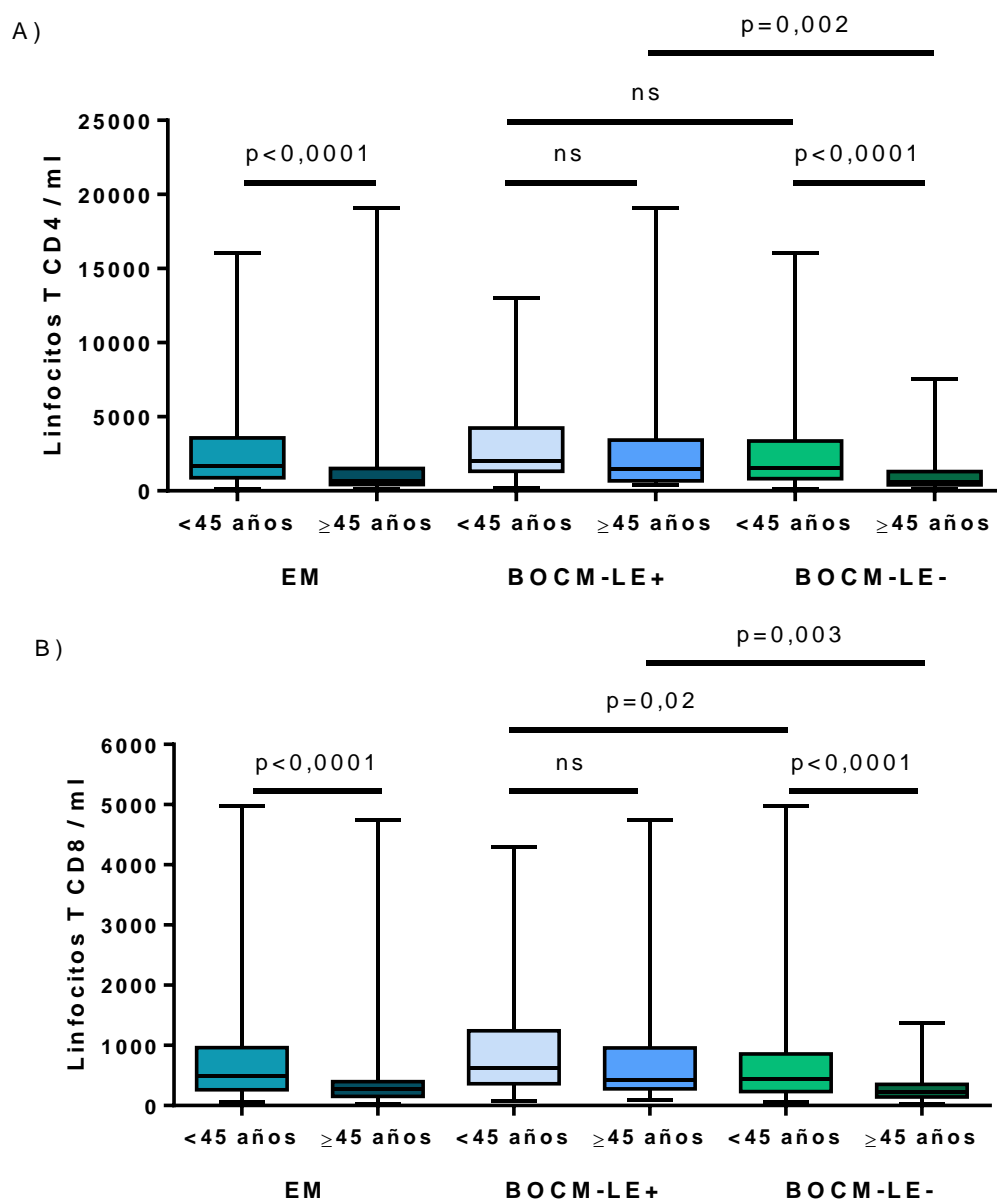


Figura 5.24: comparaciones del número de células/ml de linfocitos T CD4 (A) y linfocitos T CD8 (B) en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Entre las poblaciones de linfocitos T CD8 analizadas, fueron particularmente relevantes los resultados obtenidos en la población MR, por lo que quisimos estudiarlos en mayor profundidad (Figura 5.25)

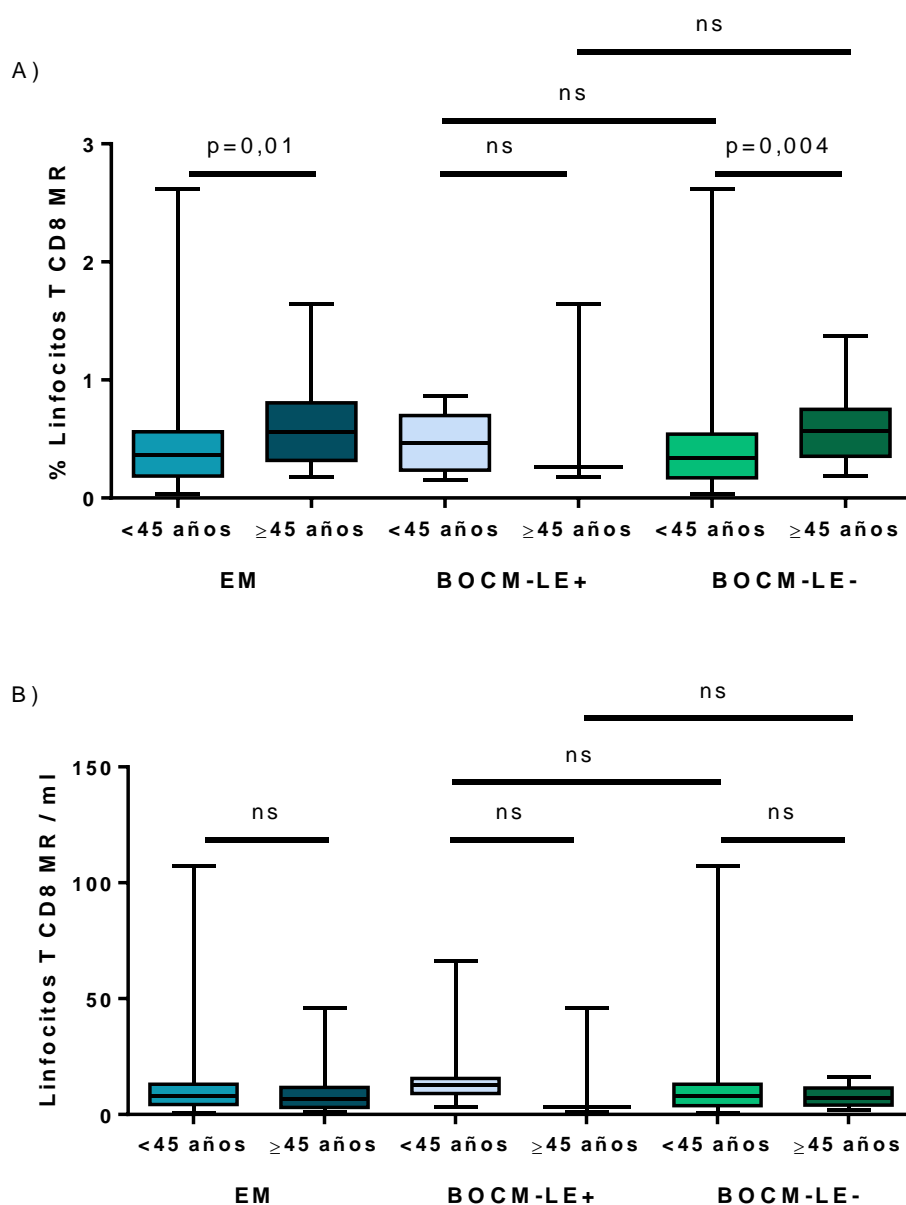


Figura 5.25: comparaciones del número de células/ml (A) y el porcentaje sobre el número de linfocitos totales de los linfocitos T CD8 MR (B) en función de la edad y las BOCM-LE. MR: memoria residente. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

El porcentaje de los linfocitos T CD8 MR se incrementó en los pacientes mayores de 45 años, lo cual sólo fue significativo en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.25 A). No encontramos diferencias significativas en su número de células/ml, ya que este se mantuvo a pesar del incremento de la edad, especialmente en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.25 B).

A continuación comparamos el número de linfocitos B/ml presentes en el LCR en función de los grupos establecidos (Figura 5.26)

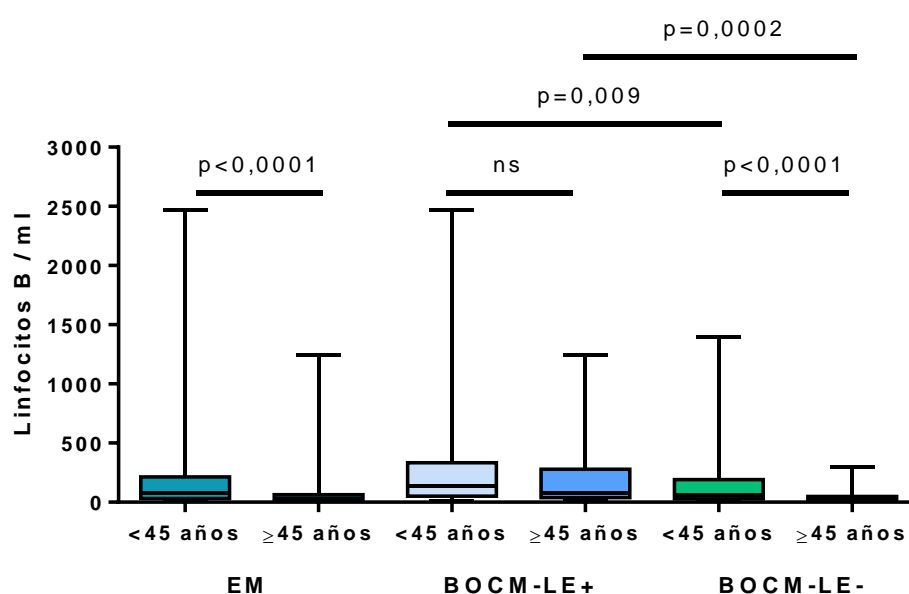


Figura 5.26: comparación del número de linfocitos B/ ml en función de la edad y las BOCM-LE.

EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Encontramos que el número de linfocitos B/ml sufría un descenso muy acusado en los pacientes mayores de 45 años (Figura 5.26). Sin embargo, dicho descenso sólo era significativo en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.26). Además, los pacientes BOCM-LE+ mostraron un mayor número de linfocitos B/ml en comparación con los BOCM-LE- en ambas franjas de edad (Figura 5.26).

Los resultados obtenidos con respecto a la producción intracelular de TNF- α por parte de los linfocitos B fueron particularmente interesantes, ya que su correlación con la edad fue significativa en el caso de los pacientes BOCM-LE+. Por ello, decidimos analizar estos resultados en mayor profundidad (Figura 5.27).

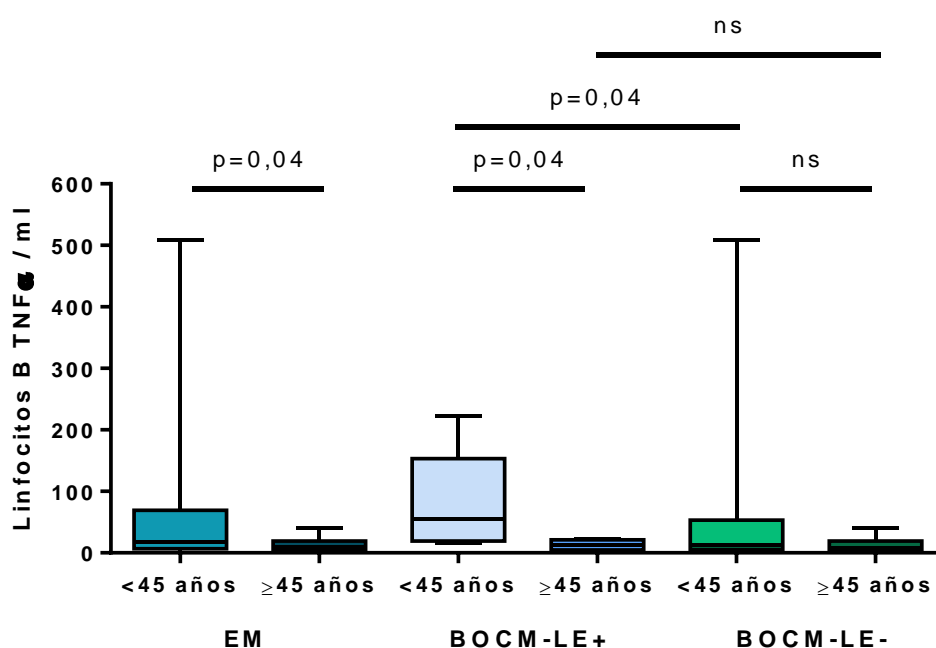


Figura 5.27: comparación del número de linfocitos B/ ml productores de TNF- α en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

El número de linfocitos B/ml productores de TNF- α disminuyó en el grupo mayor de 45 años BOCM-LE+ (Figura 5.27). Además, el número de estos linfocitos B/ml fue mayor en los pacientes BOCM-LE+ menores de 45 años en comparación con los BOCM-LE- también menores de 45 (Figura 5.27). No encontramos diferencias significativas entre los pacientes mayores de 45 años positivos y negativos para BOCM-LE (Figura 5.27). Esto podría indicar que la producción de TNF- α por parte de los

linfocitos B jugaría un papel más importante en las primeras etapas de la enfermedad en los pacientes BOCM-LE+.

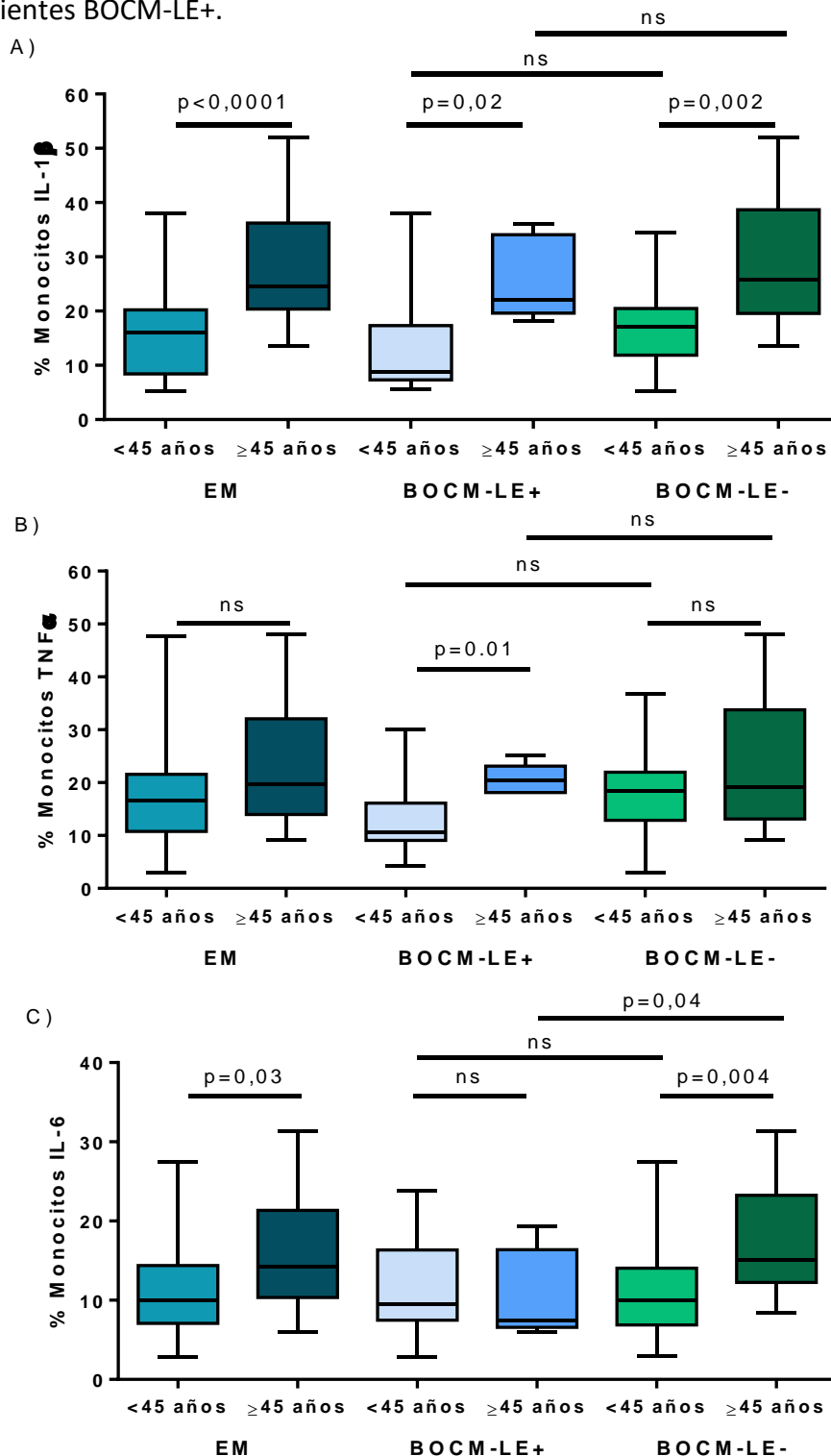


Figura 5.28: comparaciones del porcentaje con respecto a los monocitos totales de los monocitos productores de IL-1 β (A) TNF- α (B) e IL-6 (C) en función de la edad y las BOCM-LE.

EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Por último, estudiamos los cambios en los porcentajes de monocitos productores de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Figura 5.28). La producción intracelular de IL-1 β se vio incrementada en igual magnitud en los pacientes mayores de 45 años, tanto en el grupo BOCM-LE+, como en el grupo BOCM-LE- (Figura 5.28 A). El TNF- α no mostró diferencias significativas, aunque observamos una tendencia a incrementar el porcentaje de monocitos productores de dicha citoquina en los pacientes mayores de 45 años BOCM-LE+ con respecto a los menores de 45 años BOCM-LE+ ($p=0,07$) (Figura 5.28 B). Esto podría sugerir que en las primeras etapas de la enfermedad, la producción de TNF- α por parte de los linfocitos B podría desempeñar un papel relevante en estos pacientes, pero que a partir de los 45 años, estos podrían ser sustituidos por los monocitos productores de TNF- α . Finalmente, la producción intracelular de IL-6 se vio incrementada en los pacientes mayores de 45 años BOCM-LE- con respecto tanto a los pacientes menores de 45 años BOCM-LE-, como a los pacientes mayores de 45 años BOCM-LE+ (Figura 5.28 C).

5.5 ANÁLISIS DE FACTORES SOLUBLES PRESENTES EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Nuestro siguiente objetivo fue analizar los cambios relacionados con la edad que se producen en distintos factores solubles presentes en el LCR. En primer lugar estudiamos los cambios que tienen lugar en los índices de IgG e IgM. No encontramos ninguna correlación entre dichos factores y la edad (Tabla 5.19). Cuando estudiamos el cociente de albúmina sí observamos un aumento significativo, si bien la *r* era muy baja (Tabla 5.19).

Tabla 5.19: correlaciones de la edad con el índice de IgG, el índice de IgM y el cociente de albúmina.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Índice de IgG	-0,13	ns	-0,01	ns	-0,15	ns
Índice de IgM	-0,13	ns	-0,07	ns	-0,12	ns
Cociente de albúmina	0,17	0,006	0,25	ns	0,16	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM líquido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman.

Al estudiar estos factores subdividiendo a los pacientes en los grupos previamente establecidos, encontramos un leve aumento del cociente de albúmina en el grupo BOCM-LE+ mayor de 45 años. Además, obtuvimos una clara diferencia en el índice de IgM entre los pacientes BOCM-LE+ y los pacientes BOCM-LE-, ya que los

primeros mostraban niveles más altos que los segundos en los dos períodos de edad analizados (Figura 5.29).

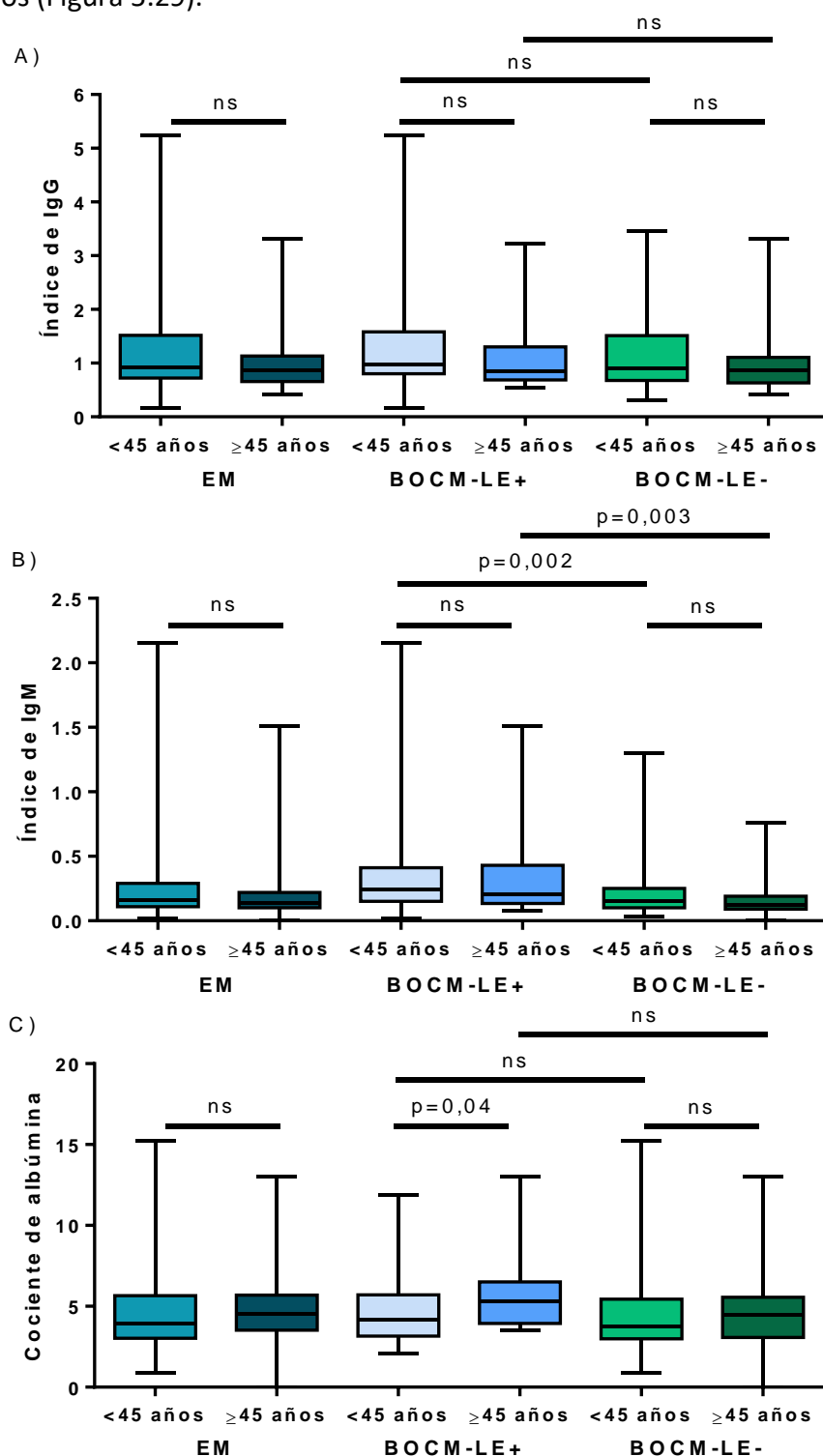


Figura 5.29: comparaciones del índice de IgG (A), índice de IgM (B) y cociente de albúmina (C) en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

A continuación, estudiamos los cambios en los niveles de NF-L en LCR, ya que dichos niveles se han consolidado como un marcador de daño axonal en diversas enfermedades neurológicas y en particular en la EM (161). De nuevo, no obtuvimos correlaciones significativas entre la edad y los niveles de NF-L en LCR en los distintos grupos de pacientes analizados. Sin embargo, al comparar los grupos, observamos que los pacientes BOCM-LE+ menores de 45 años mostraban niveles más altos de NF-L en LCR que los pacientes BOCM-LE- del mismo grupo de edad (Figura 5.30). Esto se relacionaría con el hecho de que en las primeras fases de la enfermedad los pacientes BOCM-LE+ mostraran una enfermedad más inflamatoria.

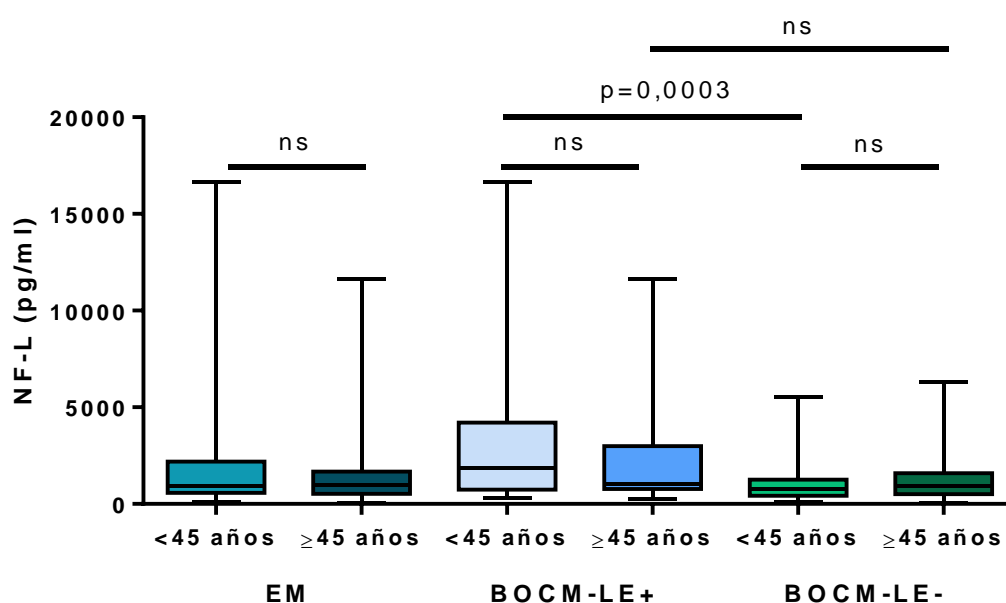


Figura 5.30: comparación de los niveles de la cadena ligera de los neurofilamentos (NF-L) en líquido cefalorraquídeo en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Posteriormente, analizamos los niveles de PD-L1 soluble presentes en el LCR de los pacientes con EM y los correlacionamos con su edad. PD-L1 es una molécula implicada en la inhibición de la respuesta inmune adaptativa (195). Observamos que en los pacientes con EM se producía un incremento relacionado con la edad en los niveles de dicha molécula ($r=0,34$; $p<0,0001$). Además, dicho incremento se produjo tanto en los pacientes positivos para BOCM-LE, como en los pacientes negativos para ese biomarcador. No obstante, el incremento fue más acusado en el caso de los pacientes BOCM-LE+ (Figura 5.31), lo cual se reflejó también al subdividir a los pacientes en distintos grupos, ya que observamos una tendencia ($p=0,07$) en los pacientes BOCM-LE+ mayores de 45 años ($(20,31\pm8,67)$ pg/ml; media \pm DS) con respecto a los menores de 45 años ($(28,89\pm14,51)$ pg/ml; media \pm DS) (Figura 5.32)

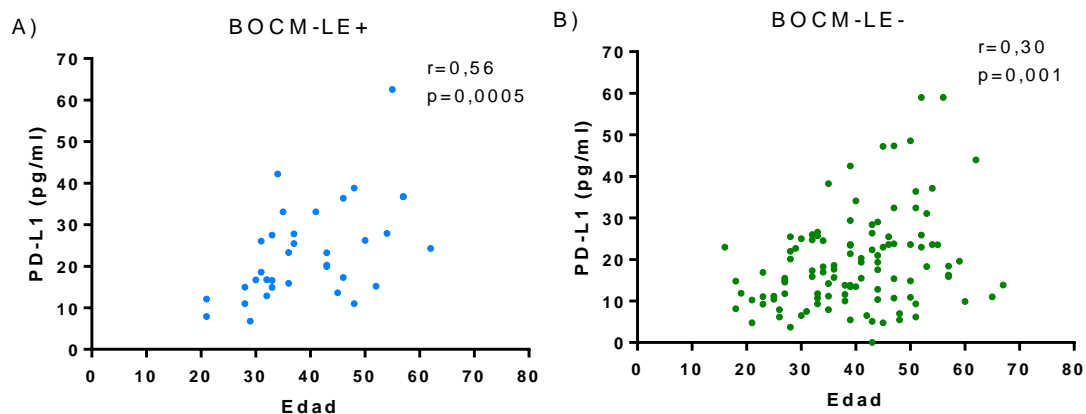


Figura 5.31: correlaciones de la edad con los niveles de PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) soluble en el LCR de los pacientes BOCM-LE+ (A) y BOCM-LE- (B).

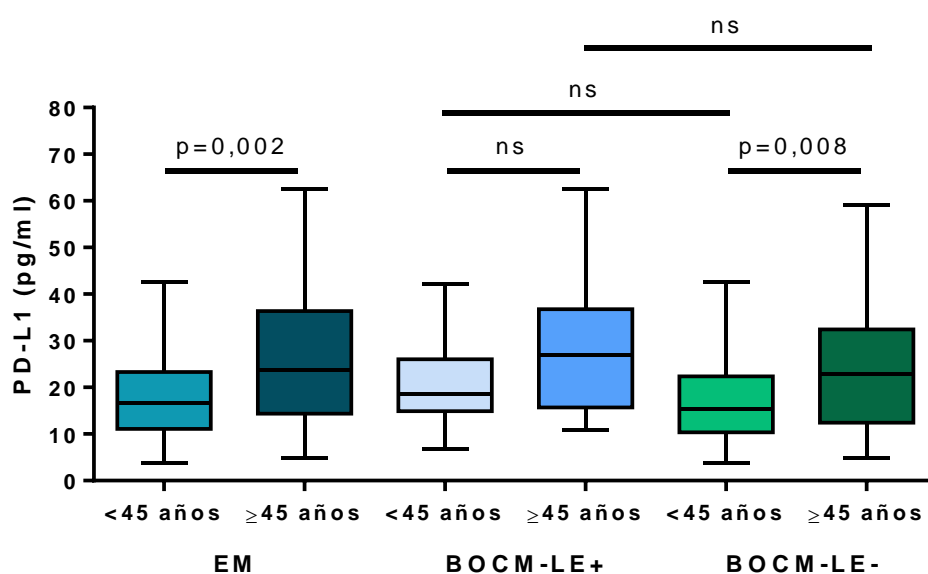


Figura 5.32: comparación de los niveles de PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) soluble en líquido cefalorraquídeo en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Finalmente, estudiamos los cambios asociados a la edad que tienen lugar en distintos factores solubles relacionados con la inmunidad innata: activina A, CHI3L1 y GFAP (Tabla 5.20). La activina A se ha relacionado con la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1 (196). La CHI3L1 se encuentra en el citoplasma de los astrocitos activados y la microglía y por último, el GFAP forma parte del citoesqueleto de los astrocitos.

Tabla 5.20: correlaciones de la edad con los factores relacionados con la inmunidad innata analizados en el LCR en los pacientes con EM.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Activina A (pg/ml)	0,47	<0,0001	0,44	0,003	0,48	<0,0001
CHI3L1 (ng/ml)	0,41	<0,0001	0,29	ns	0,49	<0,0001
GFAP (ng/ml)	0,29	0,0006	0,32	ns	0,27	0,005

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; CHI3L1: *chitinase 3-like 1*; GFAP: proteína glial fibrilar ácida.

Observamos que todos ellos se incrementaban con la edad en el grupo total de pacientes con EM (Tabla 5.20). Sin embargo, había diferencias en cuanto a la presencia o ausencia de BOCM-LE. Así, en el caso de la activina A, tanto los pacientes positivos para BOCM-LE, como los pacientes negativos, mostraron un incremento asociado a la edad de los niveles de esta (Figura 5.33). Sin embargo, la CHI3L1 y el GFAP sólo aumentaron con la edad en el grupo de pacientes BOCM-LE- (Figura 5.33). Además, dicho incremento fue más acusado en el caso de la CHI3L1 (Figura 5.33). Los cambios descritos se reflejaron a su vez en las comparaciones entre los subgrupos ya comentados (Figura 5.34). Además, destacó que los niveles de CHI3L1 en LCR fueron superiores en el grupo BOCM-LE+ menor de 45 años con respecto al grupo BOCM-LE- menor de 45 años (Figura 5.34 B)

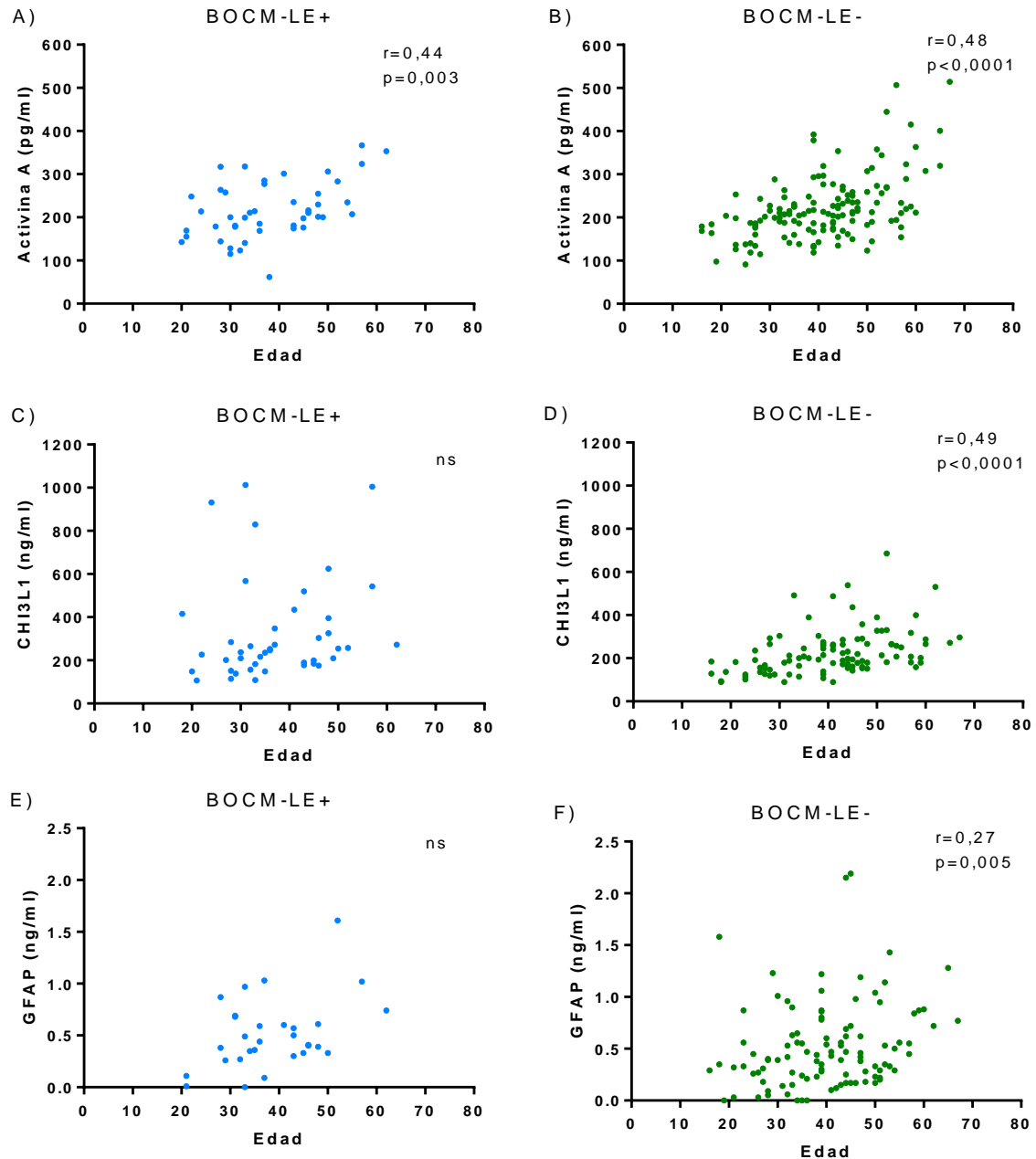


Figura 5.33: correlaciones de la edad con: (A) activina A en BOCM-LE+, (B) activina A en BOCM-LE-, (C) CHI3L1 en BOCM-LE+, (D) CHI3L1 en BOCM-LE-, (E) GFAP en BOCM-LE+ y (F) GFAP en BOCM-LE-

Globalmente, nuestros datos sugieren una activación de la respuesta inmune innata asociada a la edad en el SNC de los pacientes con EM. Además, dicha activación podría ser diferente en función de la presencia o ausencia de BOCM-LE y estaría acompañada de un descenso de la respuesta inmune adaptativa.

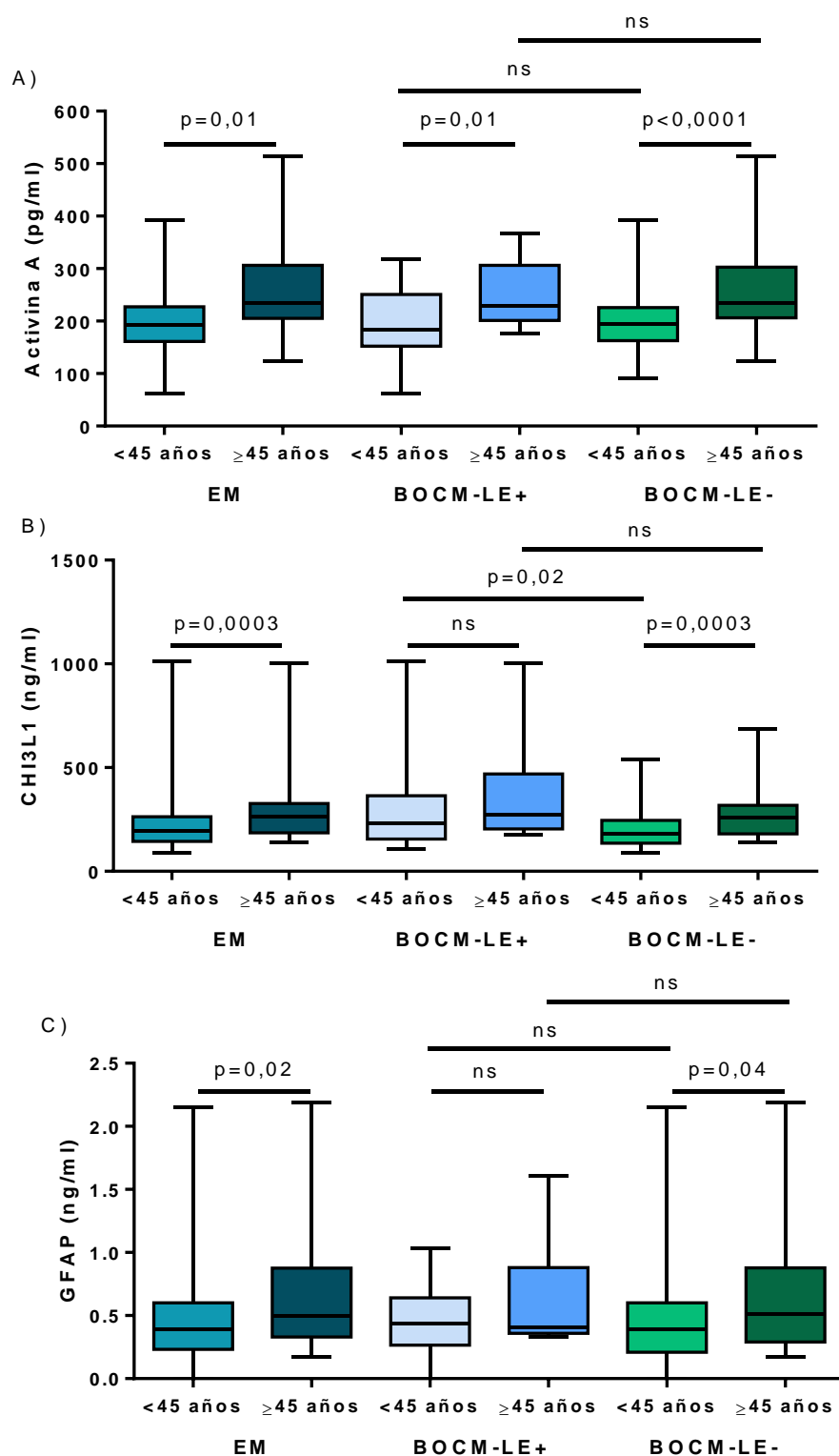


Figura 5.34: comparaciones de los niveles de activina A (A), CHI3L1 (B) y GFAP (C) en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

5.6 ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN SANGRE PERIFÉRICA

5.6.1 Anticuerpos anti-CMV IgG

Nuestro siguiente propósito fue analizar la existencia de biomarcadores asociados con la inmunosenescencia en la sangre periférica de los pacientes con EM. En primer lugar, estudiamos la presencia de anticuerpos anti-CMV IgG en suero, ya que se ha descrito su aumento en relación con el proceso de inmunosenescencia (197). Observamos que en los pacientes con EM se producía un incremento relacionado con la edad de dicho biomarcador ($r=0,28$; $p=0,0003$) y que además, este incremento se debía a la población BOCM-LE- (Figura 5.35).

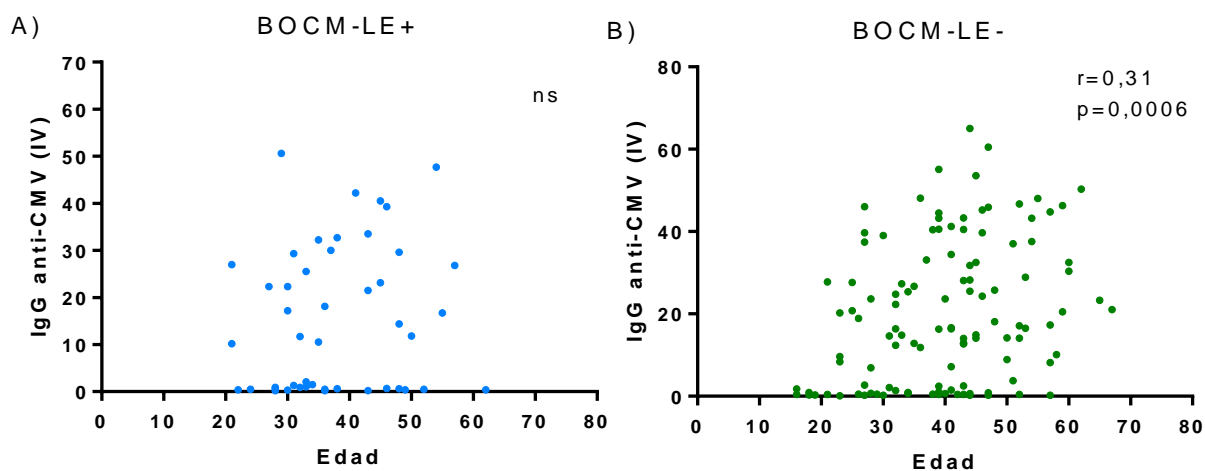


Figura 5.35: correlaciones de la edad con los niveles de IgG anti-CMV en el suero de los pacientes BOCM-LE+ (A) y BOCM-LE- (B).

Este resultado se observó también al dividir a los pacientes en los grupos previamente analizados, ya que los pacientes BOCM-LE- mayores de 45 años mostraron niveles más altos que los menores de 45 años (Figura 5.36).

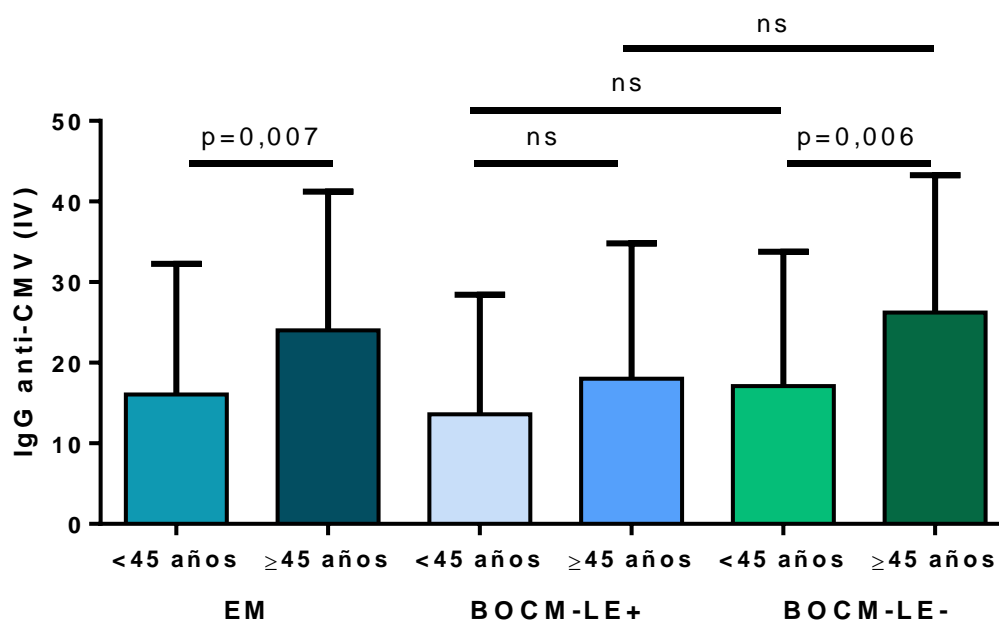


Figura 5.36: comparación de los niveles de anti-CMV IgG presentes en el suero de los pacientes con EM en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM líquido-específicas.

Estos resultados podrían sugerir que en los pacientes con EM se produciría un proceso de inmunosenescencia en torno a los 45 años que se manifestaría en la sangre periférica. Por ello, decidimos profundizar en el estudio de las poblaciones linfoides y mieloides presentes en dicho fluido.

5.6.2 Análisis de poblaciones mononucleares presentes en la sangre periférica de los pacientes con Esclerosis Múltiple

Nos propusimos analizar los cambios relacionados con la edad de las poblaciones mononucleares presentes en la sangre periférica de los pacientes con EM. Para ello, estudiamos en primer lugar los porcentajes de linfocitos, monocitos y células NK con respecto a las células mononucleares totales (Tabla 5.21). No encontramos ninguna correlación significativa de la edad con las poblaciones estudiadas.

Tabla 5.21: correlaciones de la edad con las poblaciones mononucleares de sangre periférica en los pacientes con EM.

% células	EM (n=94)		BOCM-LE+ (n=22)		BOCM-LE- (n=72)	
	r	p	r	p	r	p
Linfocitos	-0,03	ns	-0,48	ns	0,10	ns
Monocitos	-0,03	ns	0,37	ns	-0,16	ns
Células NK	-0,04	ns	0,06	ns	-0,10	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman; NK: *Natural Killer*. % células calculado con respecto al total de células mononucleares.

A continuación, exploramos los cambios en las poblaciones de linfocitos T. En primer lugar analizamos las subpoblaciones de linfocitos T CD4, pero no encontramos

ninguna correlación significativa con la edad. Estudiamos a su vez los cambios en las poblaciones de linfocitos T CD8 (Tabla 5.22) y obtuvimos que la población de linfocitos T CD8 naïve descendía con la edad en los pacientes con EM y dicho descenso se producía únicamente en el grupo BOCM-LE- (Tabla 5.22).

Tabla 5.22: correlaciones de la edad con las subpoblaciones y la producción intracelular de citoquinas de los linfocitos T CD8 de sangre periférica.

% células	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD8	-0,02	ns	-0,09	ns	-0,002	ns
Linfocitos T CD8 naïve	-0,39	0,0001	-0,43	ns	-0,37	0,001
Linfocitos T CD8 MC	0,07	ns	0,14	ns	0,08	ns
Linfocitos T CD8 ME	-0,01	ns	-0,06	ns	0,07	ns
Linfocitos T CD8 TD	0,18	ns	0,11	ns	0,21	ns
Linfocitos T CD8 efectores	0,17	ns	0,13	ns	0,20	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; MC: memoria central; ME: memoria efectora; TD: terminalmente diferenciadas. % células calculado con respecto al total de linfocitos.

En la Figura 5.37 se muestran ejemplos representativos de la población T CD8 naïve en pacientes menores y mayores de 45 años.

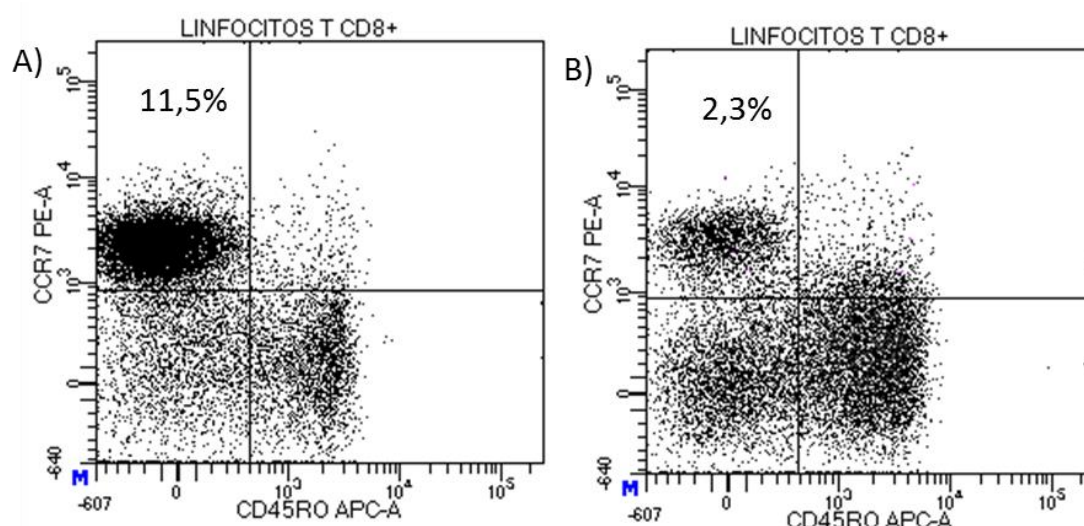


Figura 5.37: linfocitos T CD8+ naïve (CCR7+ CD45RO-) en los pacientes menores (A) y mayores (B) de 45 años. % de células calculado sobre el total de linfocitos.

Además, cuando dividimos a los pacientes según los grupos previamente establecidos en función de la edad y las BOCM-LE, obtuvimos que en los pacientes BOCM-LE- mayores de 45 años se producía un descenso de dicha población con respecto a los pacientes más jóvenes (Figura 5.38).

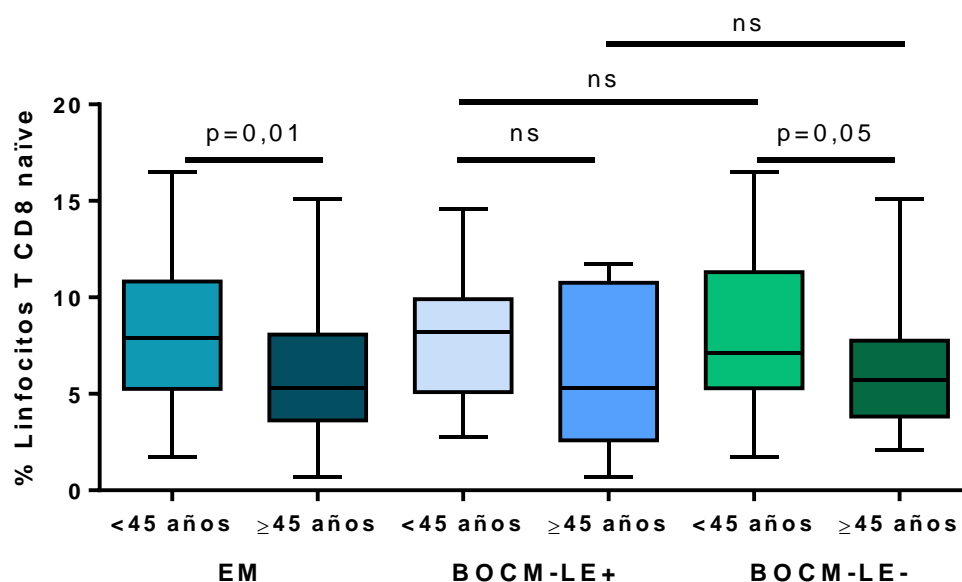


Figura 5.38: comparación de los porcentajes de linfocitos T CD8 naïve en sangre periférica en función de las BOCM-LE y la edad de 45 años. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

Cuando exploramos los linfocitos B, obtuvimos que el porcentaje de plasmablastos descendía en los pacientes con EM, si bien este descenso era significativo sólo en el grupo BOCM-LE- (Tabla 5.23).

Tabla 5.23: correlaciones de la edad con las subpoblaciones y la producción intracelular de citoquinas de los linfocitos B de sangre periférica.

% células	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	r	p	r	p	r	p
Linfocitos B	-0,02	ns	0,01	ns	-0,06	ns
Linfocitos B CD5+	-0,14	ns	-0,03	ns	-0,19	ns
Linfocitos B CD5-	0,08	ns	-0,07	ns	0,09	ns
Linfocitos B reguladores	-0,15	ns	-0,06	ns	-0,19	ns
Plasmablastos	-0,34	0,001	-0,18	ns	-0,34	0,004
Linfocitos B memoria	0,21	ns	0,05	ns	0,22	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado con respecto al total de linfocitos.

Además, dicho descenso también se reflejó al dividir a los pacientes en función de la edad y las BOCM-LE (Figura 5.39)

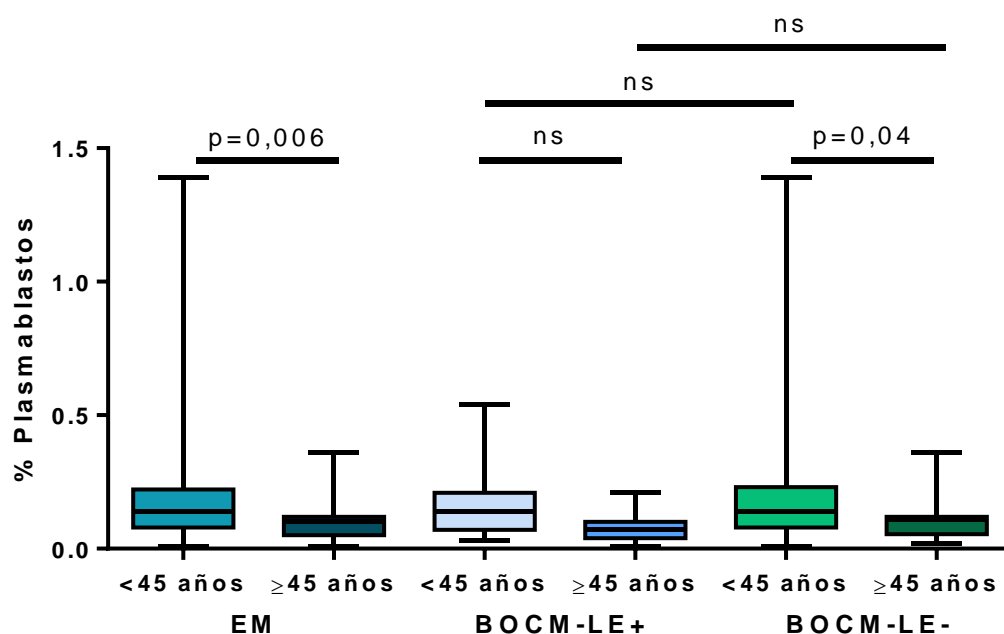


Figura 5.39: comparación de los niveles de plasmablastos en sangre periférica en función de la edad y las BOCM-LE. EM: Esclerosis Múltiple. BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido-específicas.

A continuación exploramos las células de la inmunidad innata presentes en la sangre periférica y su asociación con la edad. No encontramos ninguna correlación de la edad con las distintas poblaciones de células NK, ni tampoco con las subpoblaciones de monocitos.

Nuestros datos sugieren que en la sangre periférica de los pacientes con EM se pueden encontrar marcadores asociados al proceso de inmunosenescencia. Por ello, en último lugar nos propusimos analizar las denominadas células senescentes CD4+ (CD28- CD57+) en un pequeño grupo de pacientes y obtuvimos que su porcentaje se incrementaba con la edad en la sangre periférica de dicho grupo (Figura 5.40).

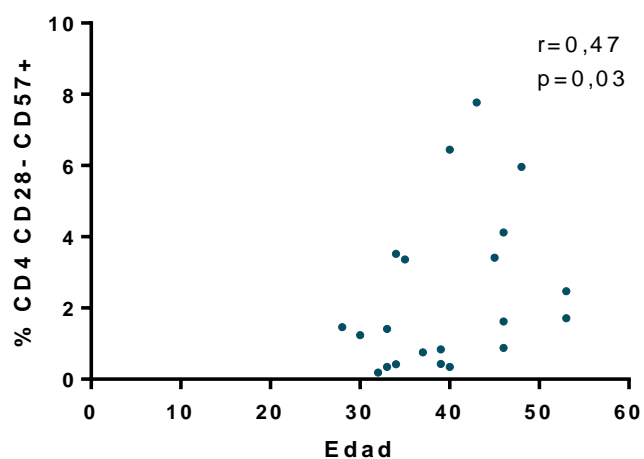


Figura 5.40: correlación de la edad con las células senescentes CD4+ (CD28- CD57+) presentes en la sangre periférica de los pacientes con Esclerosis Múltiple.

5.7 RELACIONES ENTRE LOS DATOS CLÍNICOS Y LAS VARIABLES INMUNOLÓGICAS ANALIZADAS

Finalmente, nos propusimos analizar las asociaciones existentes entre los datos clínicos recogidos y las variables inmunológicas analizadas. Para ello, en primer lugar estudiamos la correlación de la edad con las siguientes variables clínicas: lesiones en T2, lesiones captantes de Gadolinio, EDSS y MSSS, (Tabla 5.24).

Tabla 5.24: correlaciones de la edad con los datos clínicos recogidos.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Lesiones en T2	0,11	ns	0,07	ns	0,15	ns
Lesiones captantes	-0,32	<0,0001	-0,34	0,007	-0,31	<0,0001
EDSS	0,38	<0,0001	0,27	ns	0,47	<0,0001
MSSS	0,14	ns	0,17	ns	0,22	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman.

Observamos que la edad se asociaba con cambios en las lesiones que captan Gadolinio, tanto en los pacientes BOCM-LE+, como en los BOCM-LE-. Además, la edad también se asociaba con la puntuación en la escala EDSS en los pacientes con EM, si bien estos cambios sólo eran significativos en el grupo BOCM-LE-. Por ello, decidimos

estudiar los cambios relacionados con las lesiones captantes y la discapacidad en las variables inmunológicas anteriormente analizadas.

5.7.1 Lesiones captantes y variables inmunológicas

En primer lugar, analizamos las posibles relaciones existentes entre las lesiones que captan Gadolinio y las distintas variables inmunológicas estudiadas. Únicamente obtuvimos correlaciones modestas con las poblaciones del LCR enumeradas en la Tabla 5.25.

Tabla 5.25: correlaciones de las lesiones captantes con el número de células/ml presentes en el LCR de los pacientes con EM.

Células/ml	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Linfocitos T CD4 reguladores	0,23	0,001	0,07	ns	0,28	0,0009
Linfocitos B	0,20	0,003	0,16	ns	0,21	0,009

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman.

La asociación más clara se observó en los pacientes BOCM-LE- con los linfocitos T CD4 reguladores.

5.7.2 EDSS y variables inmunológicas

A continuación, analizamos las correlaciones existentes entre el EDSS y las poblaciones linfoides y mieloides estudiadas. En primer lugar, analizamos las principales poblaciones de LCR y obtuvimos las correlaciones significativas expuestas en la Tabla 5.26.

Tabla 5.26: correlaciones del EDSS con las principales células del LCR de los pacientes con EM.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	r	p	r	p	r	p
Mononucleares / ml	-0,15	ns	-0,02	ns	-0,25	0,0006
Linfocitos / ml	-0,14	ns	-0,02	ns	-0,25	0,0009
% Linfocitos	-0,18	0,004	-0,07	ns	-0,30	<0,0001
% Monocitos	0,19	0,004	0,10	ns	0,30	<0,0001

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman. % células calculado sobre el total de células mononucleares

Observamos que el número de células mononucleares/ml y el número de linfocitos/ml correlacionaban de forma inversa con el EDSS en los pacientes BOCM-LE-. Además, el porcentaje de linfocitos descendía a la vez que aumentaba el EDSS en dicho grupo BOCM-LE-; mientras que el porcentaje de monocitos correlacionaba de forma directa con el EDSS.

Analizamos las correlaciones entre el EDSS y el porcentaje del resto de poblaciones celulares estudiadas, encontrando como significativas las mostradas en la Tabla 5.27.

Tabla 5.27: correlaciones del EDSS con el porcentaje de células presentes en el LCR de los pacientes con EM.

% células	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
% Linfocitos T CD8	0,09	ns	-0,31	ns	0,22	0,003
% Monocitos IL-6	0,30	ns	0,03	ns	0,49	0,002

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman. % linfocitos T CD8 calculado sobre el total de linfocitos. % monocitos productores de IL-6 calculado sobre el total de monocitos.

Encontramos que tanto el porcentaje de linfocitos T CD8 como el porcentaje de monocitos productores de IL-6 aumentaban con el EDSS en el grupo BOCM-LE-.

A continuación, estudiamos las correlaciones entre el EDSS y el número de células/ml de las subpoblaciones del LCR, encontrando correlaciones significativas en las poblaciones mostradas en la Tabla 5.28.

Tabla 5.28: correlaciones del EDSS con el número de células/ml presentes en el LCR de los pacientes con EM.

Células/ml	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	r	p	r	p	r	p
Linfocitos T CD4	-0,13	ns	0,01	ns	-0,23	0,002
Linfocitos T CD4 reguladores	-0,10	ns	0,03	ns	-0,21	0,009
Linfocitos T CD4 IFN- γ	-0,24	0,004	-0,26	ns	-0,29	0,003
Linfocitos T CD4 IL-17	-0,21	ns	-0,06	ns	-0,26	0,008
Linfocitos B	-0,15	ns	-0,02	ns	-0,27	0,0003
Linfocitos B CD5+	-0,20	0,006	-0,14	ns	-0,30	0,0004
Linfocitos B CD5-	-0,15	ns	-0,06	ns	-0,27	0,001

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; r: coeficiente de correlación de Spearman.

Obtuvimos que en los pacientes BOCM-LE- el EDSS correlacionaba negativamente de forma modesta con el número de linfocitos/ml en las poblaciones arriba indicadas.

En sangre periférica no encontramos ninguna asociación entre el EDSS y las distintas poblaciones celulares estudiadas o el título de anticuerpos IgG anti-CMV presentes en suero.

Por último, analizamos las correlaciones existentes entre el EDSS y los factores solubles estudiados en el LCR. En la Tabla 5.29 se muestran únicamente aquellos en los que se obtuvieron correlaciones significativas.

Tabla 5.29: correlaciones del EDSS con los factores solubles analizados en el LCR de los pacientes con EM.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Activina A (pg/ml)	0,24	0,001	0,24	ns	0,25	0,004
CHI3L1 (ng/ml)	0,39	<0,0001	0,42	0,006	0,34	0,0005

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; CHI3L1: *chitinase 3-like 1*; GFAP: proteína glial fibrilar ácida.

Encontramos que tanto la activina A como la CHI3L1 correlacionaban de forma positiva con el EDSS en el grupo BOCM-LE-. Además, la CHI3L1 se asociaba también con el EDSS en el grupo BOCM-LE+, mostrando incluso un coeficiente de correlación más elevado en este grupo.

5.7.3 MSSS y variables inmunológicas

En último lugar analizamos los posibles cambios existentes entre las variables inmunológicas estudiadas y el MSSS, ya que aunque este no correlaciona con la edad, sí lo hace el grado de discapacidad y los pacientes BOCM-LE+ presentan un MSSS más elevado que los pacientes BOCM-LE-. En la Tabla 5.30 se muestran las correlaciones significativas obtenidas.

Tabla 5.30: correlaciones del MSSS con las variables inmunológicas analizadas en los pacientes con EM.

	EM		BOCM-LE+		BOCM-LE-	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
% Monocitos IL-1 β	0,36	0,01	0,81	0,004	0,39	ns
Activina A (pg/ml)	0,14	ns	0,47	0,008	0,10	ns
CHI3L1 (ng/ml)	0,31	0,006	0,48	0,01	0,25	ns

EM: Esclerosis Múltiple; BOCM-LE: bandas oligoclonales de IgM lípido específicas; *r*: coeficiente de correlación de Spearman; CHI3L1: *chitinase 3-like 1*.

Observamos que en los pacientes BOCM-LE+, el incremento del MSSS se relacionaba con el aumento de la respuesta inmune innata. Esto se reflejó en el incremento del porcentaje de monocitos productores de IL-1 β y en el aumento de la concentración de dos moléculas relacionadas con este tipo de respuesta: activina A y CHI3L1.

6. DISCUSIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es la principal enfermedad desmielinizante crónica del sistema nervioso central (SNC) en adultos jóvenes. Aunque suele aparecer entre los 18 y los 35 años, el aumento de la edad juega en ella un papel fundamental desde el punto de vista clínico. Así, en torno a los 40-50 años, los pacientes responden peor a los tratamientos inmunomoduladores administrados en la actualidad (150) y aumenta el riesgo de padecer efectos secundarios graves como la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) (151,154). Además, alrededor de dicha edad, disminuyen la tasa de brotes clínicos y el número de lesiones activas en la sustancia blanca, a la vez que desciende el componente inflamatorio en el SNC; mientras que paradójicamente aumenta la discapacidad (2,91).

En las fases iniciales de la EM, juega un papel importante la inmunidad adaptativa, ya que en las lesiones desmielinizantes aparecen infiltrados de linfocitos B y linfocitos T, acompañados de macrófagos y microglía (111). Esto se refleja en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes, donde se ha descrito un aumento en el porcentaje de linfocitos T y linfocitos B y un descenso de monocitos (198). Se ha postulado que el envejecimiento podría asociarse con la activación de la respuesta inmune innata compartimentalizada en el SNC, asociada a la disminución de la respuesta adaptativa (4,199,200). Sin embargo, el papel de estos mecanismos aún no ha podido demostrarse, y se desconocen los factores que favorecen el cambio entre la respuesta adaptativa y la innata. Tampoco está claro si este cambio se produce de forma similar en todos los pacientes, ya que la EM es una enfermedad heterogénea, en la que se encuentran pacientes con alta y baja respuesta inflamatoria desde las primeras fases de la enfermedad. En este sentido, nuestro grupo describió que la presencia de BOCM en LCR, y especialmente las BOCM-LE predicen un curso agresivo

de la enfermedad, caracterizado por un incremento del número de brotes, un mayor aumento de la discapacidad y un mayor contenido inflamatorio en el LCR (128,160). Sin embargo, se desconoce si la evolución de la enfermedad con la edad es igual en los pacientes que presentan o no BOCM-LE.

En este trabajo hemos analizado los cambios inmunológicos asociados a la edad que se producen en los pacientes con EM. Además, hemos estudiado la influencia de las BOCM-LE y el estado inmunológico inicial de los pacientes en dichos cambios. Por último hemos analizado la asociación entre las variables inmunológicas y los datos clínicos relacionados con la evolución clínica y la progresión de los pacientes.

6.1 INMUNOSENESCENCIA

El término inmunosenescencia comprende los cambios relacionados con el envejecimiento que se producen en el sistema inmune (190). En los individuos sanos estos cambios se hacen patentes en torno a los 60-70 años (190). Sin embargo, en los individuos que padecen enfermedades infecciosas o autoinmunes se ha planteado la existencia del proceso de inmunosenescencia precoz (191,192). Así, en el caso de la EM se ha descrito la aparición de marcadores de inmunosenescencia, como el descenso del número de círculos de escisión del receptor de células T (TRECs) y el aumento de células T CD28-, en la sangre periférica de un pequeño grupo de pacientes a partir de los 41-60 años (192,201). Por ello, decidimos estudiar la dinámica del sistema inmune en relación a la edad en la EM; ya que estos fenómenos podrían estar relacionados con los cambios en la respuesta a los tratamientos inmunomoduladores

(150) y el incremento de la susceptibilidad a padecer LMP, observados en los pacientes de mayor edad (154,202).

6.1.1 Poblaciones leucocitarias presentes en el LCR

Una de las principales características de la EM es la inflamación del SNC, la cual se manifiesta en el LCR con el aumento de los linfocitos T y B y el descenso de los monocitos (102,198,203). Este escenario puede evolucionar con la edad o con el desarrollo de la forma secundariamente progresiva (EMSP). En este sentido, se ha descrito que en la EMSP se producen cambios en la distribución de los linfocitos del LCR, ya que disminuye el porcentaje de linfocitos T y aumenta el de linfocitos B (204). También se ha descrito un descenso del número de linfocitos T y B asociados a las lesiones desmielinizantes en estos pacientes (111), así como un descenso asociado a la edad del número de lesiones activas en la sustancia blanca (91). Sin embargo, los estudios en tejido sólo permiten utilizar un número limitado de marcadores, lo que ha dificultado el análisis de los cambios que se producen en relación a la edad en las diferentes subpoblaciones de linfocitos y monocitos; mientras que el LCR podría ser un medio idóneo para estudiar dichos cambios. Hasta hace poco, el bajo número de células de este fluido, unido a las limitaciones de los métodos no multiparamétricos de citometría de flujo, impedían la realización de estos análisis. De este modo, los estudios de células del LCR a menudo se habían centrado en subpoblaciones aisladas (205–207) o en el estudio general de los distintos tipos de leucocitos (198,208). Además, de forma general en dichos estudios no se había dado protagonismo a la evaluación de los cambios asociados a la edad. Por ello, en este trabajo nos planteamos estudiar cómo afecta la edad al contenido inflamatorio presente en el LCR

de los pacientes con EM, ya que este refleja los cambios que tienen lugar en el SNC y la tecnología actual permite un análisis más detallado de las diferentes poblaciones celulares del LCR.

En primer lugar, encontramos que con la edad se producía un descenso en el número de células mononucleares. Al estudiar los distintos porcentajes de las principales células mononucleares, observamos una disminución relativa de los linfocitos y un aumento relativo de los monocitos. Cuando examinamos los números absolutos, observamos que con la edad se producía un descenso real de la población linfocitaria; mientras que el número de monocitos se mantenía, siendo el aumento de su porcentaje sólo un aumento relativo. Este marcado descenso de los linfocitos se produjo de forma similar en todas sus subpoblaciones analizadas. Este fenómeno podría influir en los cambios que tienen lugar desde el punto de vista clínico a partir de los 40-50 años y podría relacionarse con la disminución de la respuesta a los tratamientos inmunomoduladores y el aumento del riesgo de efectos secundarios graves observado en los pacientes en torno a dicha edad.

En vista de la posible trascendencia clínica de estos resultados, nos propusimos evaluar cómo influye el diferente perfil de los pacientes con EM en los cambios inmunológicos asociados a la edad. Por su parte, en los estudios de anatomía patológica se han descrito diferencias según los pacientes tuvieran una enfermedad patológicamente activa (con lesiones activas o expandiéndose lentamente en la sustancia blanca) o inactiva (con lesiones inactivas en la sustancia blanca). Así, los pacientes con una enfermedad inactiva mostraron un mayor descenso de la frecuencia de linfocitos B y T en las lesiones del SNC (111). En nuestro caso, clasificamos a los

pacientes en función de la presencia o ausencia de BOCM-LE, puesto que se trata de un marcador de mal pronóstico, que se asocia con un curso más agresivo de la enfermedad (128). Obtuvimos que el descenso de las células mononucleares del LCR se producía únicamente en los pacientes BOCM-LE-. Estos datos ponen de manifiesto que la heterogeneidad de la EM, no sólo aparece al inicio de la misma, sino que se mantiene al aumentar la edad de los pacientes y se refleja en el proceso de inmunosenescencia. De este modo, los pacientes que presentan un perfil menos inflamatorio muestran un claro descenso asociado a la edad de las células linfocitarias presentes en el LCR, lo cual podría ser relevante en el momento de tomar decisiones terapéuticas y llevar a cabo medicina personalizada.

Como hemos visto, a partir de los 41-60 años disminuyen el número de TRECs y aumenta el número de linfocitos T CD28- en la sangre periférica de los pacientes con EM (192,201). No obstante, los estudios referenciados se realizaron en sangre periférica y no evaluaban la aparición de estos marcadores en el SNC. Por otro lado, Frischer JM *et al*, determinaron que a partir de los 47 años de edad se igualaban las proporciones entre lesiones activas e inactivas de la sustancia blanca de los pacientes con EM. Sin embargo, estos autores no evaluaron los cambios que se producían en el LCR de los pacientes y si el cambio de patrón entre las lesiones activas e inactivas podía evidenciarse a alguna edad concreta en el LCR. Por ello, nos propusimos establecer una edad a la cual los cambios inmunológicos relacionados con la edad se hicieran patentes en el LCR. Para ello, elegimos la variable número de linfocitos/ml de LCR, que mostraba una correlación muy clara con la edad. Analizamos los cambios que se producían en dicha variable al subdividir a los pacientes en franjas de 10 años de edad y observamos que el descenso más claro se producía al alcanzar los 45 años. De

este modo, fijamos los 45 años como la edad a la cual se podían evidenciar los cambios inmunológicos en el LCR de los pacientes con EM. Así, nuestro estudio apoya la idea de la existencia de un proceso de inmunosenescencia precoz en las enfermedades autoinmunes y establece una edad concreta a la cual estos cambios se manifiestan en el LCR de los pacientes.

6.1.1.1 Linfocitos T CD4

Basándonos en estos resultados, decidimos analizar los cambios en las distintas poblaciones leucocitarias presentes en el LCR. Comenzamos por los linfocitos T CD4, ya que juegan un papel fundamental en la EM, tanto en el inicio de la cascada inflamatoria, como en el reclutamiento de las células del sistema inmune al SNC (103). Aunque su evolución en relación a la edad en el LCR no ha sido aún estudiada, se ha descrito que en muestras de tejido post-mortem de pacientes con EMSP disminuye el número de linfocitos T CD4 que infiltran el parénquima del SNC (209). Nosotros no encontramos cambios relacionados con la edad en el porcentaje de linfocitos T CD4, pero observamos el descenso de su número, en consonancia con el descenso global de los linfocitos. De nuevo, dicho descenso sólo fue significativo en el grupo BOCM-LE- e incluso los pacientes BOCM-LE- mayores de 45 años mostraron un número inferior de estas células que los pacientes BOCM-LE+ mayores de 45 años. Esto pone una vez más de manifiesto las diferencias existentes en el proceso de inmunosenescencia en función de la presencia o ausencia de las BOCM-LE.

Nos propusimos a su vez analizar los cambios relacionados con la edad en las subpoblaciones de linfocitos T CD4. Se ha visto que en los individuos sanos la mayoría de las células inmunes presentes en el LCR se corresponden con linfocitos T CD4 con

un fenotipo compatible con el de memoria central (MC) (101); mientras que, en los pacientes con EM se produce un enriquecimiento en la población efectora (113,210,211). Sin embargo, estos estudios no evalúan cómo cambia la distribución de estas subpoblaciones con la edad. Nosotros no observamos cambios asociados a la edad en los porcentajes de células CD4 naïve, MC, memoria efectora (ME) y terminalmente diferenciadas (TD). Sin embargo, sí obtuvimos un descenso en el número de todas las subpoblaciones analizadas en el grupo total de pacientes con EM, a excepción de la población TD, lo cual podría parecer paradójico en un primer momento, ya que no coincidía con el descenso global del número de linfocitos T CD4. Sin embargo, estos resultados se clarificaron al dividir a los pacientes en función de las BOCM-LE. Así, observamos que en la población BOCM-LE- descendía el número de todas las subpoblaciones; mientras que en los pacientes BOCM-LE+ se observaba un aumento del porcentaje de células TD asociado a la edad ($r=0,46$; $p=0,02$). Estos datos aportarían evidencia acerca de la dinámica de estas poblaciones en relación a la edad y resaltarían la importancia de las BOCM-LE en la caracterización del perfil inmunológico de los pacientes con EM.

Las principales poblaciones CD4 proinflamatorias asociadas con la EM son las células Th1, que secretan IFN- γ y TNF- α , y las células Th17, que secretan IL-17 (103). Se ha visto que en el LCR y la sangre periférica de los pacientes con EM aumenta la frecuencia de dichas poblaciones con respecto a los controles sanos (212). Así mismo, en aquellos pacientes que se encuentran en la fase secundariamente progresiva se ha descrito un incremento de los niveles de IFN- γ en el plasma (212) y cambios en la proporción de linfocitos T CD4 productores de IL-17 e IFN- γ presentes en el LCR (213). En el modelo de la EAE en rata se ha descrito una disminución de la frecuencia de

linfocitos T productores de IFN- γ e IL-17 en la médula espinal de los animales de mayor edad (214). En vista de las discrepancias observadas en los distintos estudios y la escasa evidencia acerca de la dinámica de estas poblaciones en relación a la edad en los pacientes con EM, nos propusimos estudiar la producción de citoquinas Th1 y Th17 por parte de los linfocitos T CD4 del LCR de los pacientes. No obtuvimos cambios en relación a la edad en los porcentajes de las células CD4 productoras de IFN- γ , TNF- α e IL-17. No obstante, el número de células/ml de todas estas poblaciones descendió en relación a la edad en los pacientes con EM y este descenso fue significativo únicamente en los pacientes BOCM-LE-, lo cual apoya una vez más la existencia de una diferente respuesta inmunológica, incluso en dos poblaciones consideradas clave en la patogenia de esta enfermedad.

En los últimos años ha crecido el interés sobre el papel del GM-CSF en la patogenia de la EM; ya que los ratones deficientes en dicha citoquina son resistentes a la inducción de la EAE (215) y el GM-CSF secretado por los linfocitos T CD4 es necesario para el desarrollo de la EAE (104). Por su parte, los pacientes con EM muestran un mayor porcentaje de células T CD4 productoras de GM-CSF en sangre periférica (216). Sin embargo, no se han estudiado los posibles cambios de esta población asociados a la edad, ni la presencia de estas células en LCR. En relación a la edad no encontramos diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD4 productores de GM-CSF, pero sí un descenso en su número. Además, cuando valoramos estos cambios en función de las BOCM-LE, encontramos que esta disminución sólo tenía lugar en el grupo BOCM-LE- y que incluso el porcentaje de estas células mostraba una cierta tendencia a incrementarse en el grupo BOCM-LE+ ($r=0,56$; $p=0,06$).

Por último, decidimos estudiar cómo evolucionan con la edad los linfocitos T CD4 reguladores, ya que se ha visto que en la EM se produce un incremento de la frecuencia de estas células en el LCR en comparación con la sangre periférica (205). Estos datos pueden parecer contradictorios, ya que en las enfermedades autoinmunes se produce una pérdida de la tolerancia, en parte debida a una falta de función por parte de las células reguladoras. Sin embargo, otros autores describieron que las células T CD4 reguladoras presentes en el LCR tenían una mayor sensibilidad a la apoptosis mediada por CD95, lo que les impediría llegar a las lesiones desmielinizantes (217). No obstante, en estos trabajos no se evaluó la dinámica de su frecuencia en relación a la edad. Nosotros no encontramos cambios en relación a la edad del porcentaje de estas células, pero sí un descenso de su número en el grupo BOCM-LE-, en concordancia con el descenso global del número de linfocitos T CD4.

6.1.1.2 Linfocitos T CD8

Aunque en la EM se ha prestado una gran atención a la población T CD4, dada su relevancia en el desarrollo de la EAE, los linfocitos T CD8 superan en número a los linfocitos T CD4 en las lesiones desmielinizantes (2,110,111). Se ha descrito que en la EMSP el número de linfocitos T CD8 presentes en el LCR es similar al encontrado en los pacientes con EMRR (203). Sin embargo, a pesar de su importancia en la patogenia de esta enfermedad, no se ha estudiado su evolución en relación a la edad en el LCR de los pacientes con EM. En primer lugar, nosotros observamos el descenso asociado a la edad del número de linfocitos T CD8 presentes en el LCR. Además, este descenso fue significativo únicamente en el grupo BOCM-LE-; mientras que los pacientes BOCM-LE+

mostraron números más elevados de estas células que los pacientes BOCM-LE- en las dos franjas de edad analizadas.

En los pacientes con EM se ha descrito el enriquecimiento de la población CD8 efectora en el LCR (113,210); pero no se ha evaluado la dinámica de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8 en función de la edad. Nosotros no encontramos cambios en los porcentajes de las distintas subpoblaciones, pero sí observamos un descenso similar del número de todas ellas (naïve, MC, ME y TD), que de nuevo únicamente fue significativo en los pacientes BOCM-LE-. De forma similar a lo encontrado en los linfocitos T CD4, las BOCM-LE pusieron de manifiesto las diferencias que tienen lugar en el proceso de inmunosenescencia en función del perfil inmunológico de los pacientes con EM.

Las células T de memoria residente (TRM) constituyen un subtipo de células de memoria que permanecen en los tejidos periféricos, no recirculan y son esenciales para el establecimiento de respuestas inmunológicas rápidas en los tejidos (122). Se han encontrado en diversas localizaciones anatómicas, incluido el SNC (122). Sin embargo, no está clara su importancia en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, ni su evolución en relación a la edad en el SNC. En nuestro estudio no observamos cambios asociados con la edad en el número de TRM en los pacientes con EM, a pesar de la disminución global del número de linfocitos T CD8. Por el contrario, al evaluar sus porcentajes, obtuvimos un incremento relativo de esta población en el grupo sin BOCM-LE. Esto podría sugerir que en los pacientes BOCM-LE-, en quienes disminuye en general la población linfoide, las células TMR jugarían un papel fundamental en la defensa frente a las infecciones.

Además de la función citotóxica de los linfocitos T CD8 mediada por las perforinas y las granzimas, la secreción de citoquinas por parte de estas células puede promover el establecimiento de la respuesta inmune (218). En este sentido, se ha descrito que en el LCR de los pacientes con EM se produce un incremento de la proporción de linfocitos T CD8 productores de citoquinas, como el IFN- γ y la IL-17, en respuesta a antígenos apoptóticos (116). Sin embargo, no se ha explorado el papel de estas citoquinas en la evolución asociada a la edad de los pacientes con EM. En nuestro análisis no observamos cambios en relación a la edad en la producción de IL-17 por parte de los linfocitos T CD8. En el caso del IFN- γ no apreciamos cambios en los porcentajes de células productoras de esta citoquina, pero sí un descenso de su número, el cual sólo fue significativo en el grupo BOCM-LE-. Con respecto a la producción de TNF- α , obtuvimos un aumento relativo de las células CD8 productoras de esta citoquina. Sin embargo, su número disminuyó en relación a la edad. Ambos cambios se observaron únicamente en los pacientes BOCM-LE-. Por último, analizamos la producción de GM-CSF por los linfocitos T CD8, obteniendo sólo el descenso de su número en el grupo total de pacientes con EM. Así mismo, cuando subdividimos en función de las BOCM-LE, comprobamos que este descenso se debía sólo a la población BOCM-LE-. Sin embargo, observamos una tendencia a incrementarse del porcentaje de dicha población en los pacientes BOCM-LE+ ($r=0,54$; $p=0,07$). Estos datos aportarían evidencia acerca de las variaciones que se producen en relación a la edad en la población T CD8 presente en el SNC de los pacientes con EM. Así mismo, apoyarían la hipótesis de que el perfil inmunológico influye en el proceso de inmunosenescencia de estos pacientes.

6.1.1.3 Linfocitos B

A pesar de que los linfocitos B desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la EM (219), su importancia había sido subestimada hasta el advenimiento de los tratamientos anti-CD20 (220). En el LCR de los pacientes con EM se observa una elevada frecuencia de linfocitos B en comparación con individuos sanos y otras patologías neurológicas no inflamatorias (102,198). Además, se ha visto que un elevado ratio de linfocitos B/monocitos en LCR se relaciona con un incremento del grado de discapacidad (198) y que un mayor número de linfocitos B se asocia con la existencia de lesiones que captan Gadolinio (221). En la EMSP y en algunos casos de EMRR se ha descrito la presencia de folículos linfoides ectópicos en las meninges, asociados a una mayor atrofia de la sustancia gris (95,96,129,222). Sin embargo, a pesar de la relevancia de los linfocitos B en la patología de esta enfermedad y en el mecanismo de acción de los nuevos tratamientos aprobados en la EM, no hay trabajos que evalúen su dinámica en función de la edad en el LCR. En primer lugar, nosotros encontramos que en los pacientes con EM se producía no sólo un descenso asociado a la edad en el número de linfocitos B, sino también de su porcentaje. Además, al subdividir en función de las BOCM-LE, observamos que esta disminución sólo tenía lugar en los pacientes sin BOCM-LE. Estos datos indicarían que la dinámica en relación a la edad de los linfocitos B también sería distinta según la presencia o ausencia de BOCM-LE y apuntarían a la necesidad de tener en cuenta este biomarcador a la hora de tomar decisiones terapéuticas.

En vista de estos resultados, nos planteamos estudiar los cambios asociados a la edad en las distintas subpoblaciones de linfocitos B presentes en el LCR de los

pacientes con EM. Se ha visto que con el proceso de inmunosenescencia en los individuos sanos tiene lugar la disminución de la población B naïve, acompañada del incremento de la población B de memoria (185). Sin embargo, estos cambios no se habían explorado en el LCR de los pacientes con EM. En nuestro estudio observamos que, en paralelo al descenso del número total de linfocitos B, se producía la disminución del número de las subpoblaciones B naïve, de memoria y de los plasmablastos. Este descenso fue más acusado en el caso de los linfocitos B naïve, llegando incluso a reflejarse en los porcentajes con respecto a los linfocitos. Al clasificar a los pacientes según la presencia de las BOCM-LE, encontramos que los cambios descritos sólo se producían en la población BOCM-LE-.

El linaje B juega un papel importante en la patogenia de la EM, ya que entre otras funciones lleva a cabo la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, demostrada por las bandas oligoclonales. En este sentido, la respuesta de anticuerpos puede ser T-dependiente (CD5-) o T-independiente (CD5+). Se ha descrito que en los pacientes BOCM-LE+ se produce un incremento de la respuesta T-independiente en el LCR (128,160). Sin embargo, no se ha analizado la evolución en el LCR de estas respuestas en relación a la edad en los pacientes con EM. En este trabajo, observamos que tanto la respuesta T-dependiente, como la T-independiente disminuyen con la edad en porcentaje y en número en los pacientes con EM. Además, dicho descenso fue similar para ambos tipos de respuesta y únicamente fue significativo en el grupo de pacientes BOCM-LE-. Esto indicaría que ambos tipos de respuesta disminuyen por igual en el LCR de los pacientes sin BOCM-LE; mientras que se mantendrían en los pacientes BOCM-LE+.

En los últimos años ha crecido el interés acerca de las diferentes funciones de los linfocitos B independientes de la producción de anticuerpos, como la presentación antigénica o la secreción de citoquinas (127). De este modo, se ha visto que en los pacientes con EM aumenta la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de los linfocitos B y que las terapias anti-CD20 favorecen la disminución de la producción de GM-CSF (223,224). No obstante, estos estudios se realizaron con células aisladas a partir de sangre periférica y no evaluaron la influencia de la edad en dichos fenómenos. En nuestro trabajo, no observamos cambios asociados a la edad en la producción de GM-CSF por parte de los linfocitos B del LCR de los pacientes con EM; pero sí en la producción de TNF- α . Así, a pesar de que no obtuvimos cambios en los porcentajes, sí observamos un descenso del número de linfocitos B productores de TNF- α , que en este caso fue significativo tanto en el grupo BOCM-LE-, como en el grupo BOCM-LE+. Nuestro trabajo muestra cómo evolucionan en relación a la edad las subpoblaciones del linaje B del LCR de los pacientes con EM, las cuales se han situado en el punto de mira desde la llegada de los nuevos fármacos anti-CD20.

6.1.1.4 Células NK

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del papel de la inmunidad innata en la patogenia y la progresión de la EM (199,200). Las células NK, como parte de este tipo de respuesta, poseen funciones efectoras citotóxicas y de secreción de citoquinas pro- y anti- inflamatorias (225). En el caso de la EM, se ha descrito el descenso de las células NK en el LCR con respecto a los individuos sanos (102), pero no se ha evaluado su evolución con la edad. En nuestro estudio vimos que el número de células NK disminuía con la edad y que este descenso sólo se producía en

la población BOCM-LE-. Así, los pacientes sin BOCM-LE ven reducido su número de células tanto de la respuesta innata, como de la respuesta adaptativa, lo que podría hacerles más susceptibles a las infecciones causantes de efectos secundarios graves, como previamente se había descrito en este grupo (208).

En vista de estos resultados, decidimos estudiar más en profundidad las distintas subpoblaciones de células NK. En los pacientes con EM se ha descrito el enriquecimiento en el LCR de la población NK CD56 *bright* con respecto a otras patologías neurológicas inflamatorias y no inflamatorias (207). Además, en los últimos años ha crecido el interés por esta población reguladora, ya que aumenta en los pacientes que responden bien a distintas terapias inmunomoduladoras (117,130,226). No obstante, estos trabajos no analizaron su dinámica en relación a la edad, la cual podría arrojar luz acerca de la peor respuesta a estos tratamientos que se observa en los pacientes de mayor edad (150). En nuestro trabajo obtuvimos una disminución en relación a la edad del número de las distintas poblaciones analizadas en el LCR: NK CD56 *dim*, NK CD56 *bright* y NKT. Dicho descenso fue similar en todas ellas y sólo se produjo en los pacientes BOCM-LE-. Estos datos podrían ser relevantes a la hora de tomar decisiones terapéuticas, ya que ayudarían a mejorar el cociente riesgo/beneficio de los distintos tratamientos.

6.1.1.5 Monocitos

Se ha visto que en las lesiones desmielinizantes de los pacientes con EM abundan los fagocitos mononucleares, que pueden ser células de la microglía o macrófagos (200). Estos últimos derivan de los monocitos periféricos que migran al SNC siguiendo los gradientes de quimiocinas, como CCL2 (227,228), o de citoquinas,

como GM-CSF (229). En el LCR de los pacientes con EMRR se ha descrito un descenso del porcentaje de monocitos con respecto a los individuos sanos y un aumento durante los períodos de remisión clínica (102). Sin embargo, no se han analizado sus posibles variaciones en relación a la edad. Nosotros observamos que con la edad se producía un aumento relativo de los monocitos; mientras que su número no se modificaba, lo que indicaba únicamente un aumento relativo de esta población. Así mismo, en paralelo al descenso de los linfocitos, este aumento sólo tuvo lugar en la población BOCM-LE-, lo que sugeriría que en estos pacientes los monocitos podrían desempeñar un papel más relevante durante las etapas tardías de la enfermedad.

Quisimos estudiar a su vez los cambios asociados a la edad en las subpoblaciones de monocitos. Se ha visto que en el LCR de los pacientes con EM se produce un incremento de los monocitos no clásicos con respecto a la sangre periférica (102), pero no se conoce su dinámica en relación a la edad. Nosotros no obtuvimos cambios significativos asociados a la edad de las distintas subpoblaciones de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos. Esto sugeriría que aunque los pacientes con EM presentan un enriquecimiento en la población no clásica, su distribución se mantendría a lo largo de la vida de estos pacientes.

Una de las características del proceso de inmunosenescencia es el incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en los fluidos biológicos (189). Por ello, nos planteamos estudiar los cambios asociados a la edad que tienen lugar en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12) y antiinflamatorias (IL-10) por parte de los monocitos presentes en el LCR. Se ha visto que los ratones deficientes en la síntesis de IL-1 β o de su receptor son resistentes al

desarrollo de la EAE (230–233) y que en dicho modelo las células productoras de esta citoquina en el SNC son los macrófagos derivados de monocitos y los neutrófilos, pero no las células de la microglía (231). Además, los estudios en el modelo de la EAE han demostrado que el bloqueo de la vía de la IL-1 β puede tener efectos beneficiosos (234,235). En vista de estos resultados, se ha planteado el uso de fármacos antagonistas de la vía de la IL-1 β como posible terapia en la EM (236). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios en pacientes de EM que determinen cuál sería la edad óptima para su utilización o qué pacientes serían susceptibles de responder mejor a estas terapias. En nuestro trabajo observamos que en los pacientes con EM se producía un incremento asociado a la edad del porcentaje de monocitos productores de IL-1 β presentes en el LCR. Además, este aumento se produjo tanto en los pacientes BOCM-LE- como en los pacientes BOCM-LE+, aunque en estos últimos el incremento fue más acusado. Nuestros datos muestran cómo se incrementa la producción de IL-1 β en el SNC de los pacientes con EM y determina que en los pacientes mayores de 45 años su síntesis es significativamente más alta, que en los pacientes menores, lo que podría condicionar una mejor respuesta a las terapias antagonistas de la IL-1 β en estos pacientes mayores.

En los pacientes con EM se ha descrito el incremento en la sangre periférica y en el LCR de los monocitos productores de TNF- α , con respecto a los individuos sanos y a otras patologías neurológicas no inflamatorias (237,238). Además, los pacientes BOCM-LE+ tienen en LCR mayores niveles de TNF- α durante los brotes clínicos que los pacientes BOCM-LE- y presentan en mayor frecuencia el alelo minoritario del SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) TNF-376 del promotor del gen del TNF- α (160). A pesar de estos datos, no se han evaluado los cambios asociados a la edad en la

producción de TNF- α por parte de los monocitos y su relación con las BOCM-LE. Nosotros encontramos que el porcentaje de monocitos productores de TNF- α se incrementaba con la edad en el LCR de los pacientes con EM. Sin embargo, este aumento estaba influenciado por la presencia de BOCM-LE, ya que sólo en los pacientes BOCM-LE+ se producía dicho incremento. De este modo, las BOCM-LE se relacionarían con cambios en la producción de TNF- α por parte de los monocitos y con su distinta evolución a lo largo de la vida de los pacientes con EM.

Se ha visto que los pacientes con EM presentan en LCR niveles más elevados de IL-6 que los pacientes con patologías neurológicas no inflamatorias (239). Además, esta citoquina es fundamental para el desarrollo *in vivo* de linfocitos Th17 y Th1 en el modelo de la EAE (240) y para la producción *in vitro* de IL-17 por parte de los linfocitos de sangre periférica de los pacientes (241), por lo que se ha planteado el bloqueo de la vía de la IL-6 como posible estrategia terapéutica en la EM (242). Se ha analizado a su vez la producción de IL-6 por parte de los monocitos de sangre periférica de los pacientes con EM, observándose un aumento de estos en comparación con los individuos sanos (243). Sin embargo, no se han estudiado los cambios en los niveles de IL-6 en relación a la edad ni la dinámica de sus células productoras en el SNC. En este trabajo, encontramos que el porcentaje de monocitos productores de IL-6 en el LCR se incrementaba en relación con la edad en los pacientes con EM. Así mismo, este aumento sólo fue significativo en el grupo BOCM-LE-, lo que sugeriría que el uso de antagonistas de la vía de IL-6 podría constituir una buena estrategia terapéutica en los pacientes sin BOCM-LE mayores de 45 años.

La IL-12 es una citoquina fundamental en la diferenciación del linfocito T a linfocito Th1, la cual, como hemos visto, constituye una de las principales poblaciones de linfocitos T implicada en la patogenia de la EM (244). Se ha descrito que los pacientes con EM presentan niveles más elevados de esta citoquina en LCR y suero que los individuos sanos (245). Además, los pacientes con EM progresiva tienen un mayor número de monocitos productores de IL-12 en sangre periférica y su tratamiento con terapias inmunosupresoras equipara dichos niveles a los encontrados en individuos sanos (246). Sin embargo, no se ha analizado la dinámica en relación a la edad de la producción de IL-12 por parte de los monocitos del SNC en los pacientes con EM. En nuestro estudio, no encontramos cambios asociados a la edad en la producción de IL-12 por parte de los monocitos del LCR, lo que sugeriría que esta población implicada en la diferenciación Th1 no modificaría su número en relación a la edad en estos pacientes.

Por último, estudiamos la producción de IL-10 por parte de los monocitos, ya que se trata de una citoquina antiinflamatoria, capaz de inhibir la respuesta Th1 y de reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos (244). Se ha visto que en las lesiones desmielinizantes se acumulan linfocitos T reguladores productores de IL-10 (247), pero no se han estudiado los fagocitos mononucleares secretores de IL-10 en el SNC de los pacientes con EM. Nosotros no observamos cambios significativos en relación a la edad en la producción de IL-10 por parte de los monocitos, lo que sugeriría que con la edad estas células de la inmunidad innata no tratarían de inhibir la respuesta proinflamatoria.

En resumen estos datos muestran la activación asociada a la edad de la respuesta inmune innata en el SNC de los pacientes con EM y que además dicha activación es diferente en función de la presencia o ausencia de las BOCM-LE.

6.1.2 Factores solubles del LCR

Nuestro siguiente objetivo fue analizar los cambios asociados a la edad que se producen en distintos factores solubles del LCR de los pacientes con EM. Uno de los hallazgos característicos de la EM en el LCR es la síntesis intratecal de IgG. Esta puede ponerse de manifiesto mediante métodos cualitativos como las BOC (193) o mediante el índice de IgG, el cual suele estar elevado en estos pacientes con respecto a los individuos sanos (248). Además, la presencia de BOCM-LE, consideradas un marcador de mal pronóstico en la EM, suele acompañarse de la elevación del índice de IgM (249). Por su parte, el cociente de albúmina puede emplearse para evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica, por lo que en algunos pacientes con EM puede estar aumentado (250). Aunque se ha estudiado el valor pronóstico de algunos de estos marcadores (251,252), no se han explorado sus posibles cambios en relación a la edad. Nosotros únicamente encontramos una ligera elevación asociada a la edad del cociente de albúmina en los pacientes con EM. Sin embargo, al realizar el estudio de correlaciones subdividiendo en función de las BOCM-LE, no encontramos ninguna significación estadística y únicamente fue significativo al comparar entre los pacientes BOCM-LE+ menores y mayores de 45 años, siendo estos últimos los que tenían un cociente de albúmina mayor.

Se ha descrito que los niveles de NF-L en LCR de los pacientes con EM son superiores a los encontrados en los individuos sanos (253) y además se han relacionado con la conversión a EM tras un síndrome neurológico aislado (SNA) (162) o un síndrome radiológico aislado (SRA) (164). Por otro lado, los niveles más elevados de NF-L en LCR se han asociado con el daño axonal y la presencia de BOCM-LE (161). En los pacientes afectados de la enfermedad de Huntington se ha visto una correlación inversa entre los niveles de NF-L de LCR y la edad (254). Sin embargo, en la EM no ha podido observarse ninguna correlación clara entre los niveles de este biomarcador en LCR y la edad, ya que las cohortes de pacientes analizadas han sido limitadas (253). No obstante, en los últimos años ha crecido el interés por los NF-L; puesto que ha surgido una nueva tecnología que permite cuantificarlos en la sangre periférica de los pacientes (165,166,255). Gracias a ella se ha descrito una correlación positiva entre los niveles de NF-L de suero y la edad. Sin embargo, esta relación no ha podido demostrarse en el LCR de los pacientes y puede incluso resultar paradójico, en vista de lo descrito en los pacientes con Huntington (254). En nuestro trabajo no encontramos ninguna asociación entre los niveles de NF-L de LCR y la edad de los pacientes con EM. Sin embargo, sí observamos que los pacientes BOCM-LE+ menores de 45 años presentaban niveles más altos de NF-L que los pacientes BOCM-LE- incluidos en ese grupo de edad. Esto podría sugerir que los niveles de NF-L en LCR reflejarían el daño axonal asociado a la respuesta inmunitaria adaptativa que tiene lugar durante la primera fase de la enfermedad, en lugar de la neurodegeneración relacionada con la respuesta innata de las fases más tardías.

La vía PD-1-PD-L1 está considerada un punto de control (*checkpoint*) implicado en la inhibición de la respuesta inmune adaptativa (256). Por ello, en patologías como

el cáncer se han empleado anticuerpos monoclonales antagonistas de esta vía, con el fin de promover la activación de la respuesta inmune contra el tumor (256). Los pacientes con EM presentan una menor expresión de PD-L1 por parte de las células de sangre periférica en comparación con los individuos sanos (257). Además, se ha descrito que su expresión en distintas poblaciones leucocitarias de sangre periférica se incrementa tras el tratamiento con diversas terapias inmunomoduladoras en la EM (195,258,259). En las lesiones desmielinizantes de los pacientes aumenta la expresión de PD-L1 en células con una morfología compatible con células de la microglía o macrófagos (260). Sin embargo, no se han analizado los niveles de PD-L1 soluble en el LCR de los pacientes con EM ni su posible dinámica en relación a la edad. En nuestro estudio, encontramos que los niveles de PD-L1 soluble del LCR de los pacientes con EM se incrementaban con la edad. Además, este aumento fue significativo tanto en la población BOCM-LE+, como en la población BOCM-LE-. Estos resultados podrían sugerir que el eje PD-1-PD-L1 estaría implicado en la disminución asociada a la edad de la respuesta inmune adaptativa observada en los pacientes con EM.

En vista de los resultados obtenidos con PD-L1 nos planteamos analizar en el LCR los cambios asociados a la edad en las siguientes moléculas relacionadas con la inmunidad innata: activina A, CHI3L1 y GFAP. La activina A pertenece a la superfamilia del TGF- β (261) y se ha relacionado con la polarización de los macrófagos de sangre periférica hacia el fenotipo proinflamatorio M1 (196). Sin embargo, no se han evaluado sus niveles en el LCR ni sus posibles cambios relacionados con la edad en los pacientes con EM. Nosotros observamos que en estos pacientes se producía un incremento asociado a la edad de los niveles de activina A y además dicho incremento era similar tanto en el grupo BOCM-LE+, como en el grupo BOCM-LE-. Estos datos podrían sugerir

que se produce un incremento de la polarización M1 en el SNC de los pacientes con EM y que este fenómeno no se ve condicionado por la presencia o ausencia de BOCM-LE.

En el tejido cerebral de los pacientes con EM se ha observado que la CHI3L1 se expresa en los astrocitos y los fagocitos (células de la microglía y macrófagos) presentes en las lesiones activas crónicas con un elevado componente inflamatorio. Por el contrario, los niveles de expresión de CHI3L1 son inferiores en las lesiones con baja actividad inflamatoria, donde se restringen únicamente al citoplasma de algunas células de la microglía o macrófagos (168). En las células del LCR se ha visto que las células que expresan dicha molécula se corresponden con los monocitos CD14 *low* (168). Además, sus niveles se han relacionado con la conversión a EM después de un SNA, el rápido aumento de la discapacidad o la aparición de la EMSP (168,169,171). Sin embargo, no se han explorado sus cambios en el LCR de los pacientes con EM en relación a la edad. En este trabajo encontramos que los niveles de CHI3L1 del LCR aumentaban con la edad. No obstante, al subdividir en función de las BOCM-LE, observamos que este incremento sólo se producía en la población BOCM-LE-. Así mismo, los niveles de CHI3L1 en LCR del grupo BOCM-LE+ menor de 45 años fueron superiores a los encontrados en la misma franja de edad de los pacientes BOCM-LE-. Esto podría indicar que en los pacientes BOCM-LE+ se produciría la activación de los astrocitos y la microglía en las primeras etapas de la enfermedad; mientras que en el grupo BOCM-LE- esto podría tener lugar en las fases más tardías.

Por último, estudiamos los niveles de GFAP del LCR de los pacientes con EM, ya que se ha visto que los pacientes con EM presentan niveles más elevados de GFAP en

el LCR que los individuos sanos (262) y que además estos se relacionan con el número de lesiones que captan Gadolinio (262) y la mayor progresión del EDSS (263). Los niveles de GFAP están considerados un marcador de astrogliosis y de daño de los astrocitos (264), por lo que podrían ser un indicador del cambio de respuesta inmune que tiene lugar en el SNC de los pacientes con EM. Sin embargo, no se han analizado sus posibles modificaciones asociadas a la edad en los pacientes con EM. Nosotros encontramos que los niveles de GFAP del LCR de estos pacientes aumentaban con la edad; pero esto únicamente fue significativo en el grupo BOCM-LE-, lo que podría conllevar que los astrocitos sufrieran un mayor daño al aumentar la edad en los pacientes BOCM-LE-.

El estudio de factores solubles apoyaría los datos obtenidos en el análisis de las células mononucleares de sangre periférica, puesto que reflejaría el aumento de la inhibición de la respuesta inmune adaptativa y el incremento de las moléculas implicadas en la respuesta inmune innata. Además, estos procesos se verían condicionados por la presencia o ausencia de las BOCM-LE.

6.1.3 Estudio de biomarcadores de sangre periférica

6.1.3.1 Anticuerpos anti-CMV IgG

Hay algunos biomarcadores que se han asociado con el proceso de inmunosenescencia, entre los que se encuentran la expansión de las células T CD8 de memoria específicas para el Citomegalovirus (CMV) y el aumento de los títulos de anticuerpos anti-CMV IgG (197,265,266). En los individuos sanos, este proceso puede evidenciarse en torno a los 80 años (197); mientras que en los pacientes con

enfermedades infecciosas o autoinmunes esto tiene lugar a una edad más temprana (191,267). En la EM, se ha descrito que los pacientes mayores de 40 años presentan títulos de anticuerpos anti-CMV más elevados que los pacientes menores de dicha edad (268). Sin embargo, no se ha explorado la posible influencia de las BOCM-LE en la evolución de estos títulos. Nosotros encontramos que únicamente en los pacientes sin BOCM-LE se producía un incremento significativo del título de anti-CMV IgG. Esto sugeriría que las diferencias relacionadas con las BOCM-LE que se observan en el proceso de inmunosenescencia del SNC podrían a su vez tener su reflejo en la sangre periférica.

6.1.3.2 Poblaciones mononucleares de sangre periférica

En vista de los resultados obtenidos al estudiar el título de anti-CMV IgG, nos planteamos analizar los cambios asociados a la edad que se producen en las células mononucleares de la sangre periférica de los pacientes con EM. Se ha visto que en la sangre de estos pacientes aparecen de forma prematura biomarcadores relacionados con la inmunosenescencia, como la disminución de los TRECs o el incremento de los linfocitos T CD28- (192,201,269). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios en pacientes con EM que evalúen cómo influye la presencia o ausencia de las BOCM-LE en los posibles cambios asociados a la edad de las distintas subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica. Este análisis podría ser de una elevada importancia clínica, ya que contribuiría al estudio y la monitorización del descenso de la eficacia de los tratamientos modificadores de la enfermedad que se ha descrito en la EM (150).

En primer lugar, nosotros no encontramos cambios relacionados con la edad en los porcentajes de linfocitos, células NK y monocitos totales en los pacientes con EM.

Tampoco encontramos ninguna correlación al subdividir en función de las BOCM-LE. Esto podría indicar, que en estos pacientes no se producen grandes cambios en la distribución de estas poblaciones en la sangre periférica, lo que a su vez sugería la necesidad de explorar más a fondo los cambios en sus diferentes subpoblaciones.

Por ello, analizamos las posibles variaciones asociadas a la edad que podrían tener lugar en las subpoblaciones de linfocitos T. Se ha descrito que en la sangre periférica de los pacientes con EM se produce un descenso relacionado con la edad de los linfocitos T CD4 y CD8 naïve (269), pero no se ha evaluado su relación con las BOCM-LE. En nuestro estudio no encontramos cambios asociados a la edad en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4. Sin embargo, observamos que se producía un descenso del porcentaje de linfocitos T CD8 naïve en el grupo BOCM-LE-. Esto indicaría que la dinámica del proceso de involución tímica, relacionado con la inmunosenescencia, podría ser diferente según la presencia o ausencia de BOCM-LE.

Con el uso de los fármacos anti-CD20 en la EM, ha crecido el interés por los linfocitos B y sus diferentes subpoblaciones (220). Se ha descrito que en los pacientes con EM se produce un incremento a edades tempranas de linfocitos B proinflamatorios, los cuales se acumulan en los individuos sanos a partir de los 60 años (270). Sin embargo, no se han estudiado los cambios relacionados con la edad de otras subpoblaciones de linfocitos B en los pacientes con EM, ni su posible relación con las BOCM-LE. En nuestro trabajo únicamente encontramos el descenso asociado a la edad del porcentaje de plasmablastos en los pacientes sin BOCM-LE. Esto podría a su vez relacionarse con la pérdida de eficacia de los tratamientos, ya que se ha descrito que

los pacientes con porcentajes más altos de plasmablastos responden mejor a los tratamientos inmunomoduladores de la EM (271).

A pesar de que diversos estudios han demostrado que algunos de los tratamientos utilizados en la EM producen cambios en los porcentajes de células NK de la sangre periférica de los pacientes (117,130,226), no se ha analizado la dinámica de estas poblaciones en relación a la edad y a las BOCM-LE. Nosotros no encontramos cambios en los porcentajes de células NK CD56 *dim*, CD56 *bright* ni NKT, tanto en la población total de pacientes, como al subdividir según las BOCM-LE. Esto indicaría que la distribución de las poblaciones de células NK no se modificaría con el incremento de la edad de los pacientes, por lo que estas no influirían en la pérdida de eficacia de los tratamientos.

Se ha descrito que en la sangre periférica de los pacientes con EM se produce un incremento del porcentaje de monocitos no clásicos en comparación con los individuos sanos (272). No obstante, no se han estudiado los posibles cambios relacionados con la edad en las distintas subpoblaciones de monocitos ni la influencia de las BOCM-LE en dichos cambios. En nuestro estudio no encontramos ninguna correlación significativa entre la edad y las diferentes subpoblaciones de monocitos, lo que sugeriría que la distribución de dichas subpoblaciones se mantendría a lo largo del tiempo en los pacientes con EM.

Por último, nos planteamos estudiar cómo cambiaba la población de células T senescentes en un pequeño grupo de pacientes, ya que se ha descrito que el porcentaje de células T CD28- se incrementa en relación a la edad en los pacientes con EM (201). Nosotros comprobamos que el porcentaje de células T senescentes

aumentaba con la edad en la sangre periférica de los pacientes con EM, aunque debido al bajo número de pacientes analizados no pudimos estudiar las posibles diferencias en función de las BOCM-LE.

Por tanto, en el análisis de los cambios relacionados con la edad de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica podemos concluir que, aunque no se observan cambios en la distribución general de subpoblaciones, el estudio más detallado de estas sí revela modificaciones asociadas a la edad. Así, se produciría un descenso de linfocitos T CD8 naïve y de plasmablastos. Además, estos cambios no tendrían lugar en todos los pacientes, ya que las BOCM-LE influirían en el proceso de inmunosenescencia, puesto que únicamente en los pacientes sin BOCM-LE se observarían los descensos descritos. Por último, únicamente en la sangre periférica de los pacientes BOCM-LE- se encontrarían estos marcadores de inmunosenescencia de forma prematura.

6.1.4 Relaciones entre los datos clínicos y las variables inmunológicas

Finalmente, nos planteamos analizar cómo influye la edad en los datos clínicos recogidos en nuestro estudio, ya que se ha descrito que algunos de ellos pueden correlacionar directa o inversamente con esta (273–276). Se ha descrito que el número de lesiones en T2 no varía en relación a la edad en los pacientes con EM (275); mientras que el número de lesiones que captan Gadolinio disminuye (276). Por otra parte, se ha visto que el EDSS se incrementa con la edad en los pacientes con EM (273). Sin embargo, en el caso del MSSS es a partir de los 35 años cuando se observa una correlación directa con la edad (274). No obstante, no se valoró la posible

influencia de las BOCM-LE en dichas asociaciones. En nuestro estudio no encontramos ninguna asociación de la edad con el número de lesiones en T2, pero sí con el número de lesiones captantes de Gadolinio, tal y como se había descrito anteriormente (276), y esto no se vio afectado por la presencia o ausencia de BOCM-LE.

Cuando estudiamos el EDSS y el MSSS en el total de los pacientes BOCM-LE+ y BOCM-LE-, observamos que el primer grupo tenía valores más elevados de ambas variables, lo cual confirma datos previos de nuestro grupo (128,158). Al analizar los cambios según la edad, observamos que el MSSS no se modificaba con esta, tanto en los pacientes BOCM-LE+, como en los BOCM-LE-; mientras que el EDSS aumentaba en los pacientes mayores BOCM-LE-. Estudiamos qué variables inmunológicas podrían correlacionar con el aumento del EDSS en este grupo. En primer lugar, vimos que el descenso del número de la mayoría de subpoblaciones linfocitarias correlacionaba inversamente con la discapacidad de forma modesta. Sin embargo, centramos nuestro interés en aquellas variables que se relacionaban directamente con el EDSS. Encontramos una correlación modesta con las concentraciones de activina A y el porcentaje de células T CD8+ en LCR; pero las correlaciones más claras se observaron con la concentración de CHI3L1 en LCR, el porcentaje de monocitos en LCR y principalmente el de monocitos productores de IL-6 ($r=0,49$). Estos datos podrían indicar que estos mecanismos inmunológicos asociados a la respuesta innata pudieran estar implicados en el aumento de la discapacidad que se observa en estos pacientes a partir de los 45 años. Sin embargo, estos procesos no se asocian con una mayor rapidez en el aumento de discapacidad, ya que el MSSS se mantiene en valores bajos en los pacientes BOCM-LE- independientemente de su edad. Estos resultados sugieren que los pacientes BOCM-LE- sufren un cambio asociado a la edad en los mecanismos

inmunológicos responsables de la fisiopatología de la enfermedad. Este cambio no parece asociarse en principio con formas más agresivas de la EM, pero sí podría dar cuenta del fracaso a tratamientos basados en la respuesta adaptativa que sufren en general los pacientes de EM con la edad y del mayor riesgo de enfermedades oportunistas como la LMP.

Finalmente, analizamos los factores inmunológicos que se asociaron con el MSSS en nuestro estudio. No observamos ninguna correlación clara en el caso de los pacientes BOCM-LE-. Sin embargo, en el grupo BOCM-LE+ se observó una clara asociación del MSSS con los valores de CHI3L1 y activina A en LCR y con el porcentaje de monocitos produciendo IL-1 β ($r=0,81$). Dado que se observa un claro aumento asociado a la edad de activina A tanto en pacientes BOCM-LE+, como BOCM-LE-, es curioso que este no se asocie con un avance más rápido de la discapacidad en los pacientes BOCM-LE-. Esto podría deberse a un efecto adicional de la síntesis intratecal de IgM sobre la respuesta innata, mediado por los receptores del complemento, lo cual podría explicar la respuesta óptima a tratamientos anti-CD20 que se ha observado en pacientes EMPP BOCM-LE+ (277).

7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. El aumento de la edad se acompaña en los pacientes con EM de un descenso de la respuesta inmune adaptativa y un incremento de la respuesta inmune innata en el LCR.
2. A la edad de 45 años los cambios inmunológicos se hacen patentes en el LCR de los pacientes con EM.
3. El perfil inmunológico de los pacientes, determinado en función de las BOCM-LE, influencia los cambios inmunológicos relacionados con la edad.
4. En los pacientes sin BOCM-LE tiene lugar un descenso generalizado de la respuesta inmune adaptativa que no se aprecia en los que presentan estos anticuerpos.
5. En ambos grupos se activa la producción de citoquinas por parte de los monocitos y por tanto tiene lugar la activación de la respuesta inmune innata, pero con un patrón desigual.
6. El estudio de moléculas solubles del LCR muestra un aumento de PD-L1 y activina A en ambos grupos y un aumento selectivo de las concentraciones de CHI3L1 y GFAP en los pacientes sin BOCM-LE.
7. En sangre periférica también se evidencian algunos cambios asociados a la edad en los pacientes sin BOCM-LE, con un aumento en el título de anticuerpos anti-CMV IgG y una disminución en los porcentajes de linfocitos T CD8 naïve y de plasmablastos.
8. El aumento de la edad en los pacientes con EM se relaciona con una disminución del número de lesiones que captan Gadolinio.
9. Los pacientes BOCM-LE+ tienen valores más elevados de EDSS y MSSS que los pacientes BOCM-LE-; pero en estos últimos el EDSS se incrementa con la edad. Además, estas diferencias en la discapacidad se relacionan con un patrón diferencial de activación de la respuesta inmune innata.
10. Todos estos cambios ponen de manifiesto la existencia de un proceso de inmunosenescencia precoz en los pacientes con EM condicionado por la presencia de BOCM-LE.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27–40.
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015 Sep 15;15(9):545–58.
3. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014 Sep 9;83(11):1022–4.
4. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012 Nov 5;8(11):647–56.
5. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018 21;391(10130):1622–36.
6. Carswell R. Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease. 1838.
7. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. 1841.
8. Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des hopitaux (Paris)*. 1868;41:554–66.
9. Pierre M. La sclérose en plaques et maladies infectieuses. *La Progres Medicale*. 1884;12:287–9.
10. Rivers TM SF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *The Journal of Experimental Medicine*. 1935;61:689–702.
11. Quincke HI. Die Lumbar punktion des Hydrocephalus. *Klin Wochenschr*. 1891;20:929–33.
12. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. *The Journal of Clinical Investigation*. 1942;21:571–7.
13. Kurtzke JF. A New Scale for Evaluating Disability in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1955;5:580–3.
14. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33:1444–52.
15. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. PROBLEMS OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS: REPORT BY THE PANEL ON THE EVALUATION OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS. *Ann N Y Acad Sci*. 1965 Mar 31;122:552–68.
16. Young IR, Hall AS, Pallis CA, Legg NJ, Bydder GM, Steiner RE. Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet*. 1981 Nov 14;2(8255):1063–6.

17. Candelieri-Merlicco A, Valero-Delgado F, Martínez-Vidal S, Lastres-Arias MDC, Aparicio-Castro E, Toledo-Romero F, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Health District III, Murcia, Spain. *Mult Scler Relat Disord*. 2016 Sep;9:31–5.
18. Hedström AK, Alfredsson L, Olsson T. Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(3):293–8.
19. Lindsey JW. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *Am J Med Genet A*. 2005 May 15;135(1):53–8.
20. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2018 Feb;20:43–7.
21. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler*. 2005 Oct;11(5):504–10.
22. Ristori G, Cannoni S, Stazi MA, Vanacore N, Cotichini R, Alfò M, et al. Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. *Ann Neurol*. 2006 Jan;59(1):27–34.
23. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*. 2013 Nov;9(11):e1003926.
24. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallström E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1108–13.
25. Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet*. 2009 Jan;5(1):e1000322.
26. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012 Aug 23;488(7412):508–11.
27. Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, et al. Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med*. 2017 27;376(17):1615–26.
28. Manousaki D, Dudding T, Haworth S, Hsu Y-H, Liu C-T, Medina-Gómez C, et al. Low-Frequency Synonymous Coding Variation in CYP2R1 Has Large Effects on Vitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2017 Aug 3;101(2):227–38.
29. Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet*. 2017;33(12):960–70.
30. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jan;13(1):25–36.

31. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS ONE*. 2010 Sep 1;5(9).
32. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):178–84.
33. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 Oct 30;215(1–2):102–7.
34. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun*. 2012 Jan;13(1):14–20.
35. Zhou Y, Zhu G, Charlesworth JC, Simpson S, Rubicz R, Göring HH, et al. Genetic loci for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 are associated with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(13):1655–64.
36. Mancuso R, Hernis A, Cavarretta R, Caputo D, Calabrese E, Nemni R, et al. Detection of viral DNA sequences in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Med Virol*. 2010 May;82(6):1051–7.
37. Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, De Las Heras V, Domínguez-Mozo MI, Bartolome M, Benito-Martin MS, et al. Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2008 Jun;14(5):595–601.
38. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol*. 2002 Jun;8(3):250–6.
39. Pormohammad A, Azimi T, Falah F, Faghihloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2850–62.
40. Alenda R, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, Mirete S, Álvarez-Cermeño JC, et al. Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2014 Aug;21(8):1096–101.
41. Ortega-Madueño I, Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, et al. Anti-human herpesvirus 6A/B IgG correlates with relapses and progression in multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104836.
42. de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Alcina A, Fedetz M, Alloza I, et al. Human endogenous retrovirus HERV-Fc1 association with multiple sclerosis susceptibility: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90182.
43. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez Á, De las Heras V, Casanova I, et al. The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53623.

44. Shamriz O, Mizrahi H, Werbner M, Shoenfeld Y, Avni O, Koren O. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2016 Sep;15(9):859–69.
45. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 03;114(40):10719–24.
46. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 03;114(40):10713–8.
47. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015 Jul;18(7):965–77.
48. Rothhammer V, Manciasfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med*. 2016;22(6):586–97.
49. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 May;14:35–45.
50. Farez MF, Manciasfroni ID, Méndez-Huergo SP, Yeste A, Murugaiyan G, Garo LP, et al. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell*. 2015 Sep 10;162(6):1338–52.
51. Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol*. 2011 Jul;21(7):536–42.
52. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS ONE*. 2011 Jan 13;6(1):e16149.
53. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2009 Sep 1;73(9):696–701.
54. Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Nicotine might have a protective effect in the etiology of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013 Jul;19(8):1009–13.
55. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*. 2009 Nov 10;73(19):1543–50.
56. Hedström AK, Lima Bomfim I, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Kockum I, et al. Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*. 2014 Mar 11;82(10):865–72.
57. Gianfrancesco MA, Acuna B, Shen L, Briggs FBS, Quach H, Belles KH, et al. Obesity during childhood and adolescence increases susceptibility to multiple sclerosis after accounting for established genetic and environmental risk factors. *Obes Res Clin Pract*. 2014 Oct;8(5):e435–447.

58. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk. *Mult Scler*. 2016;22(7):878–83.
59. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):518–22.
60. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):513–7.
61. Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Jan;86(1):26–31.
62. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Aug;15(8):509–24.
63. Lewis BP, Shih I -hung, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787–98.
64. Regev K, Healy BC, Paul A, Diaz-Cruz C, Mazzola MA, Raheja R, et al. Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018 Sep;5(5):e491.
65. Otaegui D, Baranzini SE, Armañanzas R, Calvo B, Muñoz-Culla M, Khankhanian P, et al. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS ONE*. 2009 Jul 20;4(7):e6309.
66. Sáenz-Cuesta M, Alberro A, Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Fernandez-Mercado M, Lopetegui I, et al. The First Dose of Fingolimod Affects Circulating Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 19;19(8).
67. Webb LM, Guerau-de-Arellano M. Emerging Role for Methylation in Multiple Sclerosis: Beyond DNA. *Trends Mol Med*. 2017;23(6):546–62.
68. Li X, Xiao B, Chen X-S. DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4049–59.
69. Castro K, Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2018;24(1):69–74.
70. Sokratous M, Dardiotis E, Bellou E, Tsouris Z, Michalopoulou A, Dardioti M, et al. CpG Island Methylation Patterns in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2018 Mar;64(3):478–84.
71. Kular L, Liu Y, Ruhrmann S, Zheleznyakova G, Marabita F, Gomez-Cabrero D, et al. DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1*15:01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2018 19;9(1):2397.
72. He H, Hu Z, Xiao H, Zhou F, Yang B. The tale of histone modifications and its role in multiple sclerosis. *Hum Genomics*. 2018 22;12(1):31.

73. Pedre X, Mastronardi F, Bruck W, López-Rodas G, Kuhlmann T, Casaccia P. Changed histone acetylation patterns in normal-appearing white matter and early multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*. 2011 Mar 2;31(9):3435–45.
74. Malhotra S, Villar LM, Costa C, Midaglia L, Cubedo M, Medina S, et al. Circulating EZH2-positive T cells are decreased in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2018 Oct 26;15(1):296.
75. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907–11.
76. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014 Jul 15;83(3):278–86.
77. McAlpine D, Lumsden C, Acheson E. Multiple Sclerosis: a reappraisal. Baltimore: Williams and Wilkins. 1972;225–6.
78. Poser CM. Taxonomy and diagnostic parameters in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1984;436:233–46.
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul;50(1):121–7.
80. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292–302.
81. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162–73.
82. Nuwer M. Potenciales evocados en la esclerosis múltiple. In: Esclerosis múltiple Bases clínicas y patológicas. Raine C, McFarland H, Tourtellote WW eds; 1997. p. 43–5.
83. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology*. 1980 Mar;30(3):240–4.
84. Reiber H. [Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1979 Sep;17(9):587–91.
85. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977 Sep;37(5):385–90.
86. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol*. 2005 Apr;62(4):574–7.

87. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007 Apr;17(2):210–8.
88. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 01;8(3).
89. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol.* 1993 Feb;33(2):137–51.
90. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:3116.
91. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol.* 2015 Nov;78(5):710–21.
92. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* 2017;133(1):13–24.
93. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005 Nov;128(Pt 11):2705–12.
94. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2011 Dec 8;365(23):2188–97.
95. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007 Apr;130(Pt 4):1089–104.
96. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011 Sep;134(Pt 9):2755–71.
97. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, Roncaroli F, Nicholas R, Serafini B, et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010 Oct;68(4):477–93.
98. Haider L, Simeonidou C, Steinberger G, Hametner S, Grigoriadis N, Deretzi G, et al. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014 Dec;85(12):1386–95.
99. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):335–9.
100. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, et al. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature.* 1985 Oct 26;317(6035):355–8.
101. de Graaf MT, Smitt PAES, Luitwieler RL, van Velzen C, van den Broek PDM, Kraan J, et al. Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011 Jan;80(1):43–50.

102. Alvermann S, Hennig C, Stüve O, Wiendl H, Stangel M. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis: in search of biomarkers. *JAMA Neurol.* 2014 Jul 1;71(7):905–12.
103. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 02;8(4).
104. Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):560–7.
105. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011 Oct;10(12):744–55.
106. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol.* 2011 Mar;89(3):346–51.
107. Zhang X, Zhang X, Zhuang L, Xu C, Li T, Zhang G, et al. Decreased regulatory T-cell frequency and interleukin-35 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med.* 2018 Dec;16(6):5366–72.
108. Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bistoon-Beigloo S, Bakhtiyari S, Abbaszadeh H-A, Darabi S, et al. Regulatory T cell number in multiple sclerosis patients: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2016 Jan;5:73–6.
109. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation.* 2017 09;14(1):117.
110. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1986 Jun;19(6):578–87.
111. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009 May;132(Pt 5):1175–89.
112. Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 2004 Jan;14(1):43–50.
113. Jilek S, Schlupe M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2007 Apr;123(1):105–13.
114. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
115. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2005 Sep;6(9):895–901.

116. Lolli F, Martini H, Citro A, Franceschini D, Portaccio E, Amato MP, et al. Increased CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2013 Jul 27;10:94.
117. Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldán E, et al. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. *Mult Scler*. 2018 Sep;24(10):1317–27.
118. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Posevitz-Fejfar A, Wiendl H, Klotz L. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 Feb;3(1):e183.
119. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2413–7.
120. Klonowski KD, Williams KJ, Marzo AL, Blair DA, Lingenheld EG, Lefrançois L. Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity*. 2004 May;20(5):551–62.
121. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):24–35.
122. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb;16(2):79–89.
123. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001 Mar;7(3):115–21.
124. Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, García-Villanueva M, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 2012 Jun 15;247(1–2):86–94.
125. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2010 Jun;67(6):707–14.
126. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2008 Sep;128(3):382–91.
127. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2018 Jul;19(7):696–707.
128. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):187–94.
129. Zivadinov R, Ramasamy DP, Vaneckova M, Gandhi S, Chandra A, Hagemeyer J, et al. Leptomeningeal contrast enhancement is associated with progression of cortical atrophy in MS: A retrospective, pilot, observational longitudinal study. *Mult Scler*. 2017 Sep;23(10):1336–45.
130. Milo R, Osherov M. Daclizumab and its use in multiple sclerosis treatment. *Drugs Today*. 2017 Jan;53(1):7–18.

131. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:185–217.
132. Giannetti P, Politis M, Su P, Turkheimer FE, Malik O, Keihaninejad S, et al. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain.* 2015 Jan;138(Pt 1):110–9.
133. Bohlson SS, O’Conner SD, Hulsebus HJ, Ho M-M, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol.* 2014;5:402.
134. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425–40.
135. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1533–49.
136. Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park H-J, Gale JT, Kidd GJ, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun.* 2014 Jul 22;5:4486.
137. Wheeler MA, Quintana FJ. Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Jan 2;9(1).
138. Rothhammer V, Quintana FJ. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol.* 2015 Nov;37(6):625–38.
139. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol.* 2016;37(7):427–39.
140. Markowitz CE. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology.* 2007 Jun 12;68(24 Suppl 4):S8-11.
141. Racke MK, Lovett-Racke AE. Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *J Immunol.* 2011 Feb 15;186(4):1887–90.
142. Arnon R, Aharoni R. Glatiramer Acetate: from Bench to Bed and Back. *Isr Med Assoc J.* 2019 Mar;21(3):151–7.
143. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol.* 2019 Jan;15(1):53–8.
144. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2015 Jul 20;16(7):16414–39.
145. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017 19;376(3):209–20.
146. Thomas K, Proschmann U, Ziemssen T. Fingolimod hydrochloride for the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2017 Oct;18(15):1649–60.

147. Miller AE. Oral teriflunomide in the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis: clinical evidence and long-term experience. *Ther Adv Neurol Disord*. 2017 Dec;10(12):381–96.
148. Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, Hemmer B, Warnke C, Menge T, et al. Dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Rev Neurother*. 2015 Apr;15(4):339–46.
149. Giovannoni G. Cladribine to Treat Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017 Oct;14(4):874–87.
150. Weideman AM, Tapia-Maltos MA, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. Meta-analysis of the Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments. *Front Neurol*. 2017;8:577.
151. Prosperini L, Scarpazza C, Imberti L, Cordioli C, De Rossi N, Capra R. Age as a risk factor for early onset of natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*. 2017 Oct;23(5):742–9.
152. Kolcava J, Hulova M, Benesova Y, Bednarik J, Stourac P. The value of anti-JCV antibody index assessment in multiple sclerosis patients treated with natalizumab with respect to demographic, clinical and radiological findings. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 May;30:187–91.
153. Gerevini S, Capra R, Bertoli D, Sottini A, Imberti L. Immune profiling of a patient with alemtuzumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Mult Scler*. 2019 Apr 9;1352458519832259.
154. Berger JR, Cree BA, Greenberg B, Hemmer B, Ward BJ, Dong VM, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment. *Neurology*. 2018 Apr 18;
155. Baharnoori M, Lyons J, Dastagir A, Koralnik I, Stankiewicz JM. Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 Oct;3(5):e274.
156. Loreface L, Fenu G, Gerevini S, Frau J, Coghe G, Barracciu MA, et al. PML in a person with multiple sclerosis: Is teriflunomide the felon? *Neurology*. 2018 Jan 9;90(2):83–5.
157. Group F-NBW. FDA-NIH Biomarker Working Group [Internet]. Food and Drug Administration (US); 2017 [cited 2019 Apr 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/>
158. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):222–6.
159. Tejeda-Velarde A, Costa-Frossard L, Sainz de la Maza S, Carrasco Á, Espiño M, Picón C, et al. Clinical usefulness of prognostic biomarkers in optic neuritis. *Eur J Neurol*. 2018;25(4):614–8.
160. Villar LM, Espiño M, Cavanillas ML, Roldán E, Urcelay E, de la Concha EG, et al. Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2010 Oct;137(1):51–9.

161. Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, García-Caldentey J, Espiño M, et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2015 Aug;22(8):1169–75.
162. Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC, Picón C, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology*. 2016 Sep 13;87(11):1076–84.
163. Quintana E, Coll C, Salavedra-Pont J, Muñoz-San Martín M, Robles-Cedeño R, Tomàs-Roig J, et al. Cognitive impairment in early stages of multiple sclerosis is associated with high cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain. *Eur J Neurol*. 2018;25(9):1189–91.
164. Matute-Blanch C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Rejdak K, Evdoshenko E, Makshakov G, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain*. 2018 Apr 1;141(4):1085–93.
165. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017 Jun;81(6):857–70.
166. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, Barro C, Uphaus T, Groppa S, et al. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018 Mar 1;1352458518765666.
167. Kim D-H, Park H-J, Lim S, Koo J-H, Lee H-G, Choi JO, et al. Regulation of chitinase-3-like-1 in T cell elicits Th1 and cytotoxic responses to inhibit lung metastasis. *Nat Commun*. 2018 05;9(1):503.
168. Cantó E, Tintoré M, Villar LM, Costa C, Nurtdinov R, Álvarez-Cermeño JC, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. 2015 Apr;138(Pt 4):918–31.
169. Comabella M, Fernández M, Martin R, Rivera-Vallvé S, Borrás E, Chiva C, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain*. 2010 Apr;133(Pt 4):1082–93.
170. Thouvenot E, Hinsinger G, Demattei C, Uygunoglu U, Castelnovo G, Pittion-Vouyovitch S, et al. Cerebrospinal fluid chitinase-3-like protein 1 level is not an independent predictive factor for the risk of clinical conversion in radiologically isolated syndrome. *Mult Scler*. 2019 Apr;25(5):669–77.
171. Cantó E, Reverter F, Morcillo-Suárez C, Matesanz F, Fernández O, Izquierdo G, et al. Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012 Jul;18(7):983–90.
172. Yang X, Huang Q, Yang H, Liu S, Chen B, Liu T, et al. Astrocytic damage in glial fibrillary acidic protein astrocytopathy during initial attack. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 Apr;29:94–9.
173. Abdelhak A, Huss A, Kassubek J, Tumani H, Otto M. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2018 Oct 4;8(1):14798.

174. Abdelhak A, Hottenrott T, Morenas-Rodríguez E, Suárez-Calvet M, Zettl UK, Haass C, et al. Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker? *Front Neurol*. 2019;10:280.
175. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: An overview. *J Immunol Methods*. 2018 Dec;463:21–6.
176. Carvalhal Marques F, Volovik Y, Cohen E. The roles of cellular and organismal aging in the development of late-onset maladies. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:1–23.
177. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194–217.
178. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):376–89.
179. Bolton C, Smith PA. The influence and impact of ageing and immunosenescence (ISC) on adaptive immunity during multiple sclerosis (MS) and the animal counterpart experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Ageing Res Rev*. 2018 Jan;41:64–81.
180. Xu W, Larbi A. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 10;18(8).
181. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res*. 2011 May;157(2):175–9.
182. Veel E, Westera L, van Gent R, Bont L, Otto S, Ruijsink B, et al. Impact of Aging, Cytomegalovirus Infection, and Long-Term Treatment for Human Immunodeficiency Virus on CD8+ T-Cell Subsets. *Front Immunol*. 2018;9:572.
183. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol*. 2003 Jul;23(4):247–57.
184. Pritz T, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age. *Immunol Lett*. 2014 Nov;162(1 Pt B):310–5.
185. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev*. 2011 Jul;10(3):330–5.
186. Aprahamian T, Takemura Y, Goukassian D, Walsh K. Ageing is associated with diminished apoptotic cell clearance in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jun;152(3):448–55.
187. Zacca ER, Crespo MI, Acland RP, Roselli E, Núñez NG, Maccioni M, et al. Aging Impairs the Ability of Conventional Dendritic Cells to Cross-Prime CD8+ T Cells upon Stimulation with a TLR7 Ligand. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0140672.
188. Bailey KL, Smith LM, Heires AJ, Katafiasz DM, Romberger DJ, LeVan TD. Aging leads to dysfunctional innate immune responses to TLR2 and TLR4 agonists. *Aging Clin Exp Res*. 2018 Nov 7;

189. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol.* 2018 Jan;19(1):10–9.
190. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci.* 2015 Dec 22;282(1821):20143085.
191. Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6825493.
192. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, et al. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2007 May;123(2):209–18.
193. Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, et al. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology.* 2006 Feb 28;66(4):576–8.
194. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Keir G. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods.* 2001 Dec 1;258(1–2):151–5.
195. Trabattoni D, Saresella M, Pacei M, Marventano I, Mendozzi L, Rovaris M, et al. Costimulatory pathways in multiple sclerosis: distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease. *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):4984–93.
196. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood.* 2011 May 12;117(19):5092–101.
197. Alonso Arias R, Moro-García MA, Echeverría A, Solano-Jaurrieta JJ, Suárez-García FM, López-Larrea C. Intensity of the humoral response to cytomegalovirus is associated with the phenotypic and functional status of the immune system. *J Virol.* 2013 Apr;87(8):4486–95.
198. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2001 Nov;124(Pt 11):2169–76.
199. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008 Mar;255 Suppl 1:3–11.
200. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015 Apr;14(4):406–19.
201. Thewissen M, Linsen L, Somers V, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1051:255–62.
202. Prosperini L, Scarpazza C, Imberti L, Cordioli C, De Rossi N, Capra R. Age as a risk factor for early onset of natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 2017;23(5):742–9.

203. Han S, Lin YC, Wu T, Salgado AD, Mexhitaj I, Wuest SC, et al. Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases. *J Immunol*. 2014 Mar 15;192(6):2551–63.
204. Wurth S, Kuenz B, Bsteh G, Ehling R, Di Pauli F, Hegen H, et al. Cerebrospinal fluid B cells and disease progression in multiple sclerosis - A longitudinal prospective study. *PLoS ONE*. 2017;12(8):e0182462.
205. Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, Wiendl H. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2007 Mar;147(3):412–8.
206. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Haemmerle M, Rainer C, et al. Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2008 Jul 2;3(7):e2559.
207. Rodríguez-Martín E, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, Sainz de la Maza S, Roldán E, et al. Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2015 May;180(2):243–9.
208. Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B, et al. Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Ann Neurol*. 2015 Mar;77(3):447–57.
209. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018 Jul 1;141(7):2066–82.
210. Mullen KM, Gocke AR, Allie R, Ntranos A, Grishkan IV, Pardo C, et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J Neuroimmunol*. 2012 Aug 15;249(1–2):86–92.
211. Vrethem M, Dahle C, Ekerfelt C, Forsberg P, Danielsson O, Ernerudh J. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls. *Acta Neurol Scand*. 1998 Apr;97(4):215–20.
212. Arellano G, Acuña E, Reyes LI, Ottum PA, De Sarno P, Villarroel L, et al. Th1 and Th17 Cells and Associated Cytokines Discriminate among Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis Phenotypes. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2019 Mar 13];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5491887/>
213. Kadowaki A, Saga R, Lin Y, Sato W, Yamamura T. Gut microbiota-dependent CCR9+CD4+ T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2019 Feb 15;
214. Djikić J, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Bufan B, Kosec D, et al. Age-associated changes in rat immune system: Lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Gerontology*. 2014 Oct 1;58:179–97.

215. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, et al. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Exp Med*. 2001 Oct 1;194(7):873–82.
216. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, et al. Expression of GM-CSF in T cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN- β therapy. *J Immunol*. 2015 Jun 1;194(11):5085–93.
217. Fritzsche B, Haas J, König F, Kunz P, Fritzsche E, Pöschl J, et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS ONE*. 2011 Mar 18;6(3):e17988.
218. Kish DD, Li X, Fairchild RL. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):5949–59.
219. Sospedra M. B cells in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2018;31(3):256–62.
220. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol*. 2018;83(1):13–26.
221. Eggers EL, Michel BA, Wu H, Wang S-Z, Bevan CJ, Abounasr A, et al. Clonal relationships of CSF B cells in treatment-naïve multiple sclerosis patients. *JCI Insight*. 2017 Nov 16;2(22).
222. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2004 Apr;14(2):164–74.
223. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naïve human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6092–9.
224. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*. 2015 Oct 21;7(310):310ra166.
225. Edwards SC, McGinley AM, McGuinness NC, Mills KHG. $\gamma\delta$ T Cells and NK Cells - Distinct Pathogenic Roles as Innate-Like Immune Cells in CNS Autoimmunity. *Front Immunol*. 2015;6:455.
226. Smith MD, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate treatment alters NK cell function in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2018;48(2):380–3.
227. Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisäkk P, Tucky B, et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. 2006 Jan;129(Pt 1):212–23.
228. Howe CL, LaFrance-Corey RG, Goddery EN, Johnson RK, Mirchia K. Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation*. 2017 Dec 4;14(1):238.
229. Vogel DYS, Kooij G, Heijnen PDAM, Breur M, Peferoen LAN, van der Valk P, et al. GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. *Eur J Immunol*. 2015 Jun;45(6):1808–19.

230. Schiffenbauer J, Streit WJ, Butfiloski E, LaBow M, Edwards C, Moldawer LL. The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. *Clin Immunol*. 2000 May;95(2):117–23.
231. Lévesque SA, Paré A, Mailhot B, Bellver-Landete V, Kébir H, Lécuyer M-A, et al. Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 β -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Exp Med*. 2016 30;213(6):929–49.
232. Ronchi F, Basso C, Preite S, Reboldi A, Baumjohann D, Perlini L, et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. *Nat Commun*. 2016 18;7:11541.
233. Paré A, Mailhot B, Lévesque SA, Juzwik C, Ignatius Arokia Doss PM, Lécuyer M-A, et al. IL-1 β enables CNS access to CCR2hi monocytes and the generation of pathogenic cells through GM-CSF released by CNS endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 06;115(6):E1194–203.
234. Badovinac V, Mostarica-Stojković M, Dinarello CA, Stosić-Grujčić S. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. *J Neuroimmunol*. 1998 May 1;85(1):87–95.
235. Furlan R, Bergami A, Brambilla E, Butti E, De Simoni MG, Campagnoli M, et al. HSV-1-mediated IL-1 receptor antagonist gene therapy ameliorates MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Gene Ther*. 2007 Jan;14(1):93–8.
236. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Aug;11(8):633–52.
237. Navikas V, He B, Link J, Haglund M, Söderström M, Fredrikson S, et al. Augmented expression of tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Brain*. 1996 Feb;119 (Pt 1):213–23.
238. Matusevicius D, Navikas V, Söderström M, Xiao BG, Haglund M, Fredrikson S, et al. Multiple sclerosis: the proinflammatory cytokines lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha are upregulated in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J Neuroimmunol*. 1996 May;66(1–2):115–23.
239. Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1991 Apr;32(1):67–74.
240. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Jul 1;105(26):9041–6.
241. Ferreira TB, Hygino J, Barros PO, Teixeira B, Kasahara TM, Linhares UC, et al. Endogenous interleukin-6 amplifies interleukin-17 production and corticoid-resistance in peripheral T cells from patients with multiple sclerosis. *Immunology*. 2014 Dec;143(4):560–8.



242. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014 Feb;141(2):125–39.
243. Fiedler SE, George JD, Love HN, Kim E, Spain R, Bourdette D, et al. Analysis of IL-6, IL-1 β and TNF- α production in monocytes isolated from multiple sclerosis patients treated with disease modifying drugs. *J Syst Integr Neurosci.* 2017 May;3(3).
244. Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang J-H, Sun Y. The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. *Am J Med Sci.* 2018 Dec;356(6):552–60.
245. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. Correlations between IL-4, IL-12 levels and CCL2, CCL5 levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neural Transm (Vienna).* 2005 Jun;112(6):797–803.
246. Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15;102(4):671–8.
247. Zandee SEJ, O'Connor RA, Mair I, Leech MD, Williams A, Anderton SM. IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3+ T cells in multiple sclerosis brain lesions. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(5):484–90.
248. Puthenparampil M, Altinier S, Stropparo E, Zywicki S, Poggiali D, Cazzola C, et al. Intrathecal K free light chain synthesis in multiple sclerosis at clinical onset associates with local IgG production and improves the diagnostic value of cerebrospinal fluid examination. *Mult Scler Relat Disord.* 2018 Oct;25:241–5.
249. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedström AK, Hillert J, Alvarez-Cermeño JC, Masterman T, et al. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Nov;14(9):1208–13.
250. LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2016 Apr 12;16:47.
251. Ozakbas S, Cinar BP, Özcelik P, Baser H, Kosehasanoğullari G. Intrathecal IgM index correlates with a severe disease course in multiple sclerosis: Clinical and MRI results. *Clin Neurol Neurosurg.* 2017 Sep;160:27–9.
252. Kroth J, Ciolac D, Fleischer V, Koirala N, Krämer J, Muthuraman M, et al. Increased cerebrospinal fluid albumin and immunoglobulin A fractions forecast cortical atrophy and longitudinal functional deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2019 Mar;25(3):338–43.
253. Cai L, Huang J. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;14:2241–54.
254. Szejko N, Picón C, García-Caldentey J, de Yebenes JG, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, et al. Quantification of the Light Subunit of Neurofilament Protein in Cerebrospinal Fluid of Huntington's Disease Patients. *PLoS Curr.* 2018 Aug 31;10.
255. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology.* 2019 Mar 5;92(10):e1007–15.

-
256. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 19;
257. Javan MR, Aslani S, Zamani MR, Rostamnejad J, Asadi M, Farhoodi M, et al. Downregulation of Immunosuppressive Molecules, PD-1 and PD-L1 but not PD-L2, in the Patients with Multiple Sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2016 Aug;15(4):296–302.
258. Liu Y, Carlsson R, Comabella M, Wang J, Kosicki M, Carrion B, et al. FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nat Med*. 2014 Mar;20(3):272–82.
259. Medina S, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, et al. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Feb;6(2):355–63.
260. Ortler S, Leder C, Mittelbronn M, Zozulya AL, Knolle PA, Chen L, et al. B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2008 Jun;38(6):1734–44.
261. Su X, Huang L, Xiao D, Qu Y, Mu D. Research Progress on the Role and Mechanism of Action of Activin A in Brain Injury. *Front Neurosci*. 2018;12:697.
262. Kassubek R, Gorges M, Schocke M, Hagenston VAM, Huss A, Ludolph AC, et al. GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neurosci Lett*. 2017 Sep 14;657:166–70.
263. Martínez MAM, Olsson B, Bau L, Matas E, Cobo Calvo Á, Andreasson U, et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015 Apr;21(5):550–61.
264. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2015 Nov;161(1):51–8.
265. Pawelec G, McElhaney JE, Aiello AE, Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):507–11.
266. Söderberg-Nauclér C, Fornara O, Rahbar A. Cytomegalovirus driven immunosenescence-An immune phenotype with or without clinical impact? *Mech Ageing Dev*. 2016;158:3–13.
267. Rothe K, Quandt D, Schubert K, Rossol M, Klingner M, Jasinski-Bergner S, et al. Latent Cytomegalovirus Infection in Rheumatoid Arthritis and Increased Frequencies of Cytolytic LIR-1+CD8+ T Cells. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2016 Feb;68(2):337–46.
268. Alari-Pahissa E, Moreira A, Zabalza A, Alvarez-Lafuente R, Munteis E, Vera A, et al. Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: a case for the “hygiene hypothesis”? *Eur J Neurol*. 2018;25(7):925–33.
269. Hug A, Korpö M, Schröder I, Haas J, Glatz K, Storch-Hagenlocher B, et al. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):432–7.

-
270. Claes N, Fraussen J, Vanheusden M, Hellings N, Stinissen P, Van Wijmeersch B, et al. Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol*. 2016 15;197(12):4576–83.
271. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, García-Grande A, Rodríguez-Esparragoza L, Elvira V, et al. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. *Front Immunol*. 2018;9:1693.
272. Gjelstrup MC, Stilund M, Petersen T, Møller HJ, Petersen EL, Christensen T. Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(2):160–74.
273. Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, Zhu F, Carruthers R, Ramanujam R, et al. Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler*. 2017 Dec;23(14):1938–46.
274. Ramachandran S, Strange RC, Jones PW, Kalra S, Nayak D, Hawkins CP. Associations between onset age and disability in multiple sclerosis patients studied using MSSS and a progression model. *Mult Scler Relat Disord*. 2014 Sep;3(5):593–9.
275. Rasche L, Scheel M, Otte K, Althoff P, van Vuuren AB, Gieß RM, et al. MRI Markers and Functional Performance in Patients With CIS and MS: A Cross-Sectional Study. *Front Neurol*. 2018;9:718.
276. Tortorella C, Bellacosa A, Paolicelli D, Fuiani A, Di Monte E, Simone IL, et al. Age-related gadolinium-enhancement of MRI brain lesions in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2005 Dec 15;239(1):95–9.
277. Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2014 Aug;76(2):231–40.

9. ANEXO

Clinical usefulness of prognostic biomarkers in optic neuritis

A. Tejeda-Velarde^{a,b} , L. Costa-Frossard^{b,c}, S. Sainz de la Maza^{b,c}, Á. Carrasco^a, M. Espiño^{a,b}, C. Picón^{a,b}, I. Toboso^{a,b}, P. E. Walo^a, D. Lourido^d, A. Muriel^e, J. C. Álvarez-Cermeño^{b,c,f,*} and L. M. Villar^{a,b,*} 

^aImmunology Department, IRYCIS, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; ^bThe Spanish Network of Multiple Sclerosis (REEM); ^cNeurology Department, IRYCIS, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; ^dRadiology Department, IRYCIS, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; ^eBiostatistics Unit, IRYCIS CIBERESP, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; and ^fMedicine Department, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain

Keywords:

antibodies,
demyelinating diseases,
multiple sclerosis, optic
neuritis

Received 31 July 2017

Accepted 18 December 2017

*European Journal of
Neurology* 2018, **25**: 614–618

doi:10.1111/ene.13553

Background and purpose: Different biological and radiological biomarkers predict clinical conversion to multiple sclerosis (MS) after a clinically isolated syndrome (CIS). The aim was to explore their role in predicting the outcome of patients with optic neuritis (ON), a CIS considered to have a benign prognosis.

Methods: Sixty-eight consecutive ON patients were followed prospectively. Magnetic resonance imaging (MRI) and cerebrospinal fluid studies including oligoclonal immunoglobulin G (IgG) bands (OCGBs), lipid-specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMBs) and neurofilament light chain quantification were performed at disease onset. Conversion to clinically definite MS (CDMS) was monitored.

Results: The mean time of follow-up of our series was 46.4 months. Twenty-five patients (36.7%) developed CDMS during follow-up. Neurofilament light chain levels did not predict clinical conversion. By contrast, an abnormal MRI increased the risk of CDMS [hazard ratio (HR) 12.5, $P = 0.013$]. The clearest association was found in patients with more than three T2 lesions. OCGBs also predicted the onset of CDMS (HR 21.3, $P = 0.003$) and LS-OCMBs were associated with a shorter time to CDMS (HR = 116.6, $P < 0.001$).

Conclusions: Magnetic resonance imaging and OCGBs predicted conversion to CDMS after an ON episode. In addition, LS-OCMBs identified the ON patients more likely to develop MS early. These results, applicable to the everyday clinical setting, may be of interest for therapeutic decisions.

Introduction

Optic neuritis (ON) can be the first episode of neurological diseases such as multiple sclerosis (MS), recurrent ON or neuromyelitis optica (NMO), or remain as an isolated episode [1]. After 15 years, about 50% of

patients presenting with ON will develop MS [2]. In fact, ON is the first clinical manifestation in 20% of MS patients [3]. It has been described that having ON as the first episode of MS is a good prognostic marker [4,5]. However, MS is a heterogeneous disease and even patients initiating with ON may have an aggressive disease course. Thus, accurate biomarkers that predict clinical conversion to MS early after an ON episode are of great clinical interest, especially since early treatment is beneficial to avoid disease progression in MS patients [6,7].

Magnetic resonance imaging (MRI) is widely accepted for predicting conversion to MS after a clinically isolated syndrome (CIS) [8]. However, there is some controversy about the risk associated with different numbers of T2 lesions in ON patients.

Oligoclonal immunoglobulin G (IgG) bands (OCGBs) are useful to predict ON conversion to

Correspondence: L. M. Villar, Immunology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Viejo km. 9.100, 28034 Madrid, Spain (tel.: +34913368795; fax: +34913368809; e-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org).

*These two authors were principal co-investigators

This is a Continuing Medical Education article, and can be found with corresponding questions on the EAN website, LEARN section <https://www.ean.org/CME.2714.0.html>. Certificates for correctly answered questions will be issued by EAN directly, you simply have to be logged-in. With positive results, EAN recommends accreditation of 1 hour of CME, which may be claimed with the national body in charge of CME accreditation. This paper is being simultaneously published in *European Journal of Neurology* and *Multiple Sclerosis Journal*.

clinically definite MS (CDMS) [8,9], although they do not inform about the quickness of the second relapse. Moreover, OCGBs have not been studied in conjunction with lipid-specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMBs) in ON patients. LS-OCMBs are considered a marker of highly inflammatory MS with a shorter time to a second relapse and a worse disease prognosis [10]. In addition, cerebrospinal fluid (CSF) levels of neurofilament light protein (NFL) have emerged as a biomarker of clinical conversion to MS in CIS [11]. High levels predict incomplete remission after an ON episode and higher disability in the long term [12,13].

Our objective was to explore the value of these radiological and biological biomarkers, easily implemented in clinical laboratories, in a cohort of ON patients in predicting an early CDMS conversion.

Methods

Patients

This study was approved by the ethical committee of Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain). Seventy-two consecutive patients (47 females, 25 males) with an age of 32.3 ± 1.2 years (mean \pm SE) diagnosed with ON were included prospectively. Written informed consent was obtained from every patient before entry.

Patients were prospectively followed and assessed every 6 months, with additional visits in the case of relapse. Conversion to CDMS was evaluated by monitoring the onset of a second relapse [14,15]. Relapses were defined as a worsening of neurological impairment or an appearance of a new symptom or abnormality attributable to MS, lasting at least 24 h, and preceded by stability of at least 1 month.

Magnetic resonance imaging study

An MRI of the brain was performed after the ON episode in 1.5 T scanners with standard head coils (Philips ACHIEVA, Eindhoven, The Netherlands). Slice thicknesses of 5 mm were acquired to obtain contiguous axial sections that covered the entire brain. The following sequences were performed: T1 weighted imaging, axial fluid-attenuated inversion recovery T2, axial T2 weighted imaging and axial proton density T2 weighted imaging.

Magnetic resonance imaging studies showing at least one T2 lesion suggesting demyelination were established as abnormal. The number of T2 lesions was also stratified in four levels: 0 lesions, 1–3 lesions, 4–9 lesions and ≥ 10 lesions.

Cerebrospinal fluid analyses

Paired serum and CSF samples were obtained for diagnostic purposes and stored at -80°C until assessed. IgG, IgM and albumin were quantified by nephelometry, using an Immage Nephelometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). OCGBs, OCMBs and LS-OCMBs were determined by isoelectric focusing and immunoblotting, as previously described [10,16].

Neurofilament light protein levels were measured in CSF by enzyme-linked immunosorbent assay (Uman Diagnostics, Umea, Sweden), following the manufacturer's instructions. The cut-off values used were 400 ng/l (which is above the interquartile range found in healthy individuals [17]) and 900 ng/l, which is above the median + 2SD values found in other non-inflammatory or neurodegenerative neurological diseases [18].

Serum NMO IgG antibodies were tested by indirect immunofluorescence (IIF) using a commercial cell-based assay (CBA) (Euroimmun, Luebeck, Germany) with recombinant human full-length aquaporin-4. Serum anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) IgG antibodies were tested by IIF using a commercial CBA (Euroimmun) with recombinant human full-length MOG.

Statistical analysis

Absolute and relative frequencies were assessed to describe categorical variables. Mean and standard deviation or median and interquartile range were used for continuous variables. For comparison between MS and ON, the Mann–Whitney *U* test was applied for non-parametric tests and Pearson's chi-squared for normal groups. The Fisher exact test was used for categorical variable comparisons between groups.

The Kaplan–Meier test was performed for survival analysis and Cox regression for hazard ratio (HR) calculations.

P values below 0.05 were considered significant. Results were analyzed with STATA v.13 (Stata-Corp.2013, Statistical Software: Release 13, College Station, TX, USA).

Results

In all, 72 patients presenting with ON studied at Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain) were included in the study. Two of them showed anti-NMO antibodies. They were diagnosed as NMO spectrum disorder patients and were excluded from the study. Another two patients had anti-MOG antibodies and they were also excluded as the presence of these

antibodies was considered as a possible confounding variable. The remaining 68 patients were followed for 46.4 ± 5.4 months (mean \pm SE) and clinical conversion to MS was studied. An MRI study was performed within 0.44 ± 0.09 months (mean \pm SE). CSF and serum samples were obtained within 2.62 ± 0.30 months (mean \pm SE).

Twenty-five patients (36.7%) suffered a second relapse and were diagnosed as CDMS during follow-up. Sixty-five patients presented with unilateral ON, whilst the other three showed a bilateral episode. Eight patients had a new episode of ON during follow-up. No differences in clinical or epidemiological data were found at ON onset between patients classified according to clinical conversion status (Table 1). Conversely, it was found that patients having a second attack had a higher number of T2 lesions ($P = 0.001$), increased IgG index ($P = 0.01$) and a higher percentage of OCGBs ($P < 0.001$) and LS-OCMBs ($P = 0.001$). No significant differences in NFL levels were found between MS and ON, although patients who converted clinically to MS tended to have higher values ($P = 0.07$) (Table 1).

Next patients were stratified depending on whether they had high or normal CSF NFL levels by using two different cut-off values [17,18]. Increased values did not predict the onset of a second relapse (Table 2).

The presence of an abnormal MRI study was a good predictive factor, when analyzed globally (HR 12.5, $P = 0.01$, Table 2). However, when stratified according to lesion number, having one to three T2 lesions did not significantly associate with the onset of a second relapse, although a trend was observed ($P = 0.057$). A significant association was only found in patients showing more than three T2

lesions, the risk being independent of the lesion number in this group (Table 2).

Oligoclonal IgG bands were also associated with the onset of a second relapse (Table 2), and studied in combination with the presence of LS-OCMBs indicated the probability of early clinical conversion to MS. Patients were classified in three groups according to the absence of both OCGBs and LS-OCMBs (G–M–), the presence of only OCGBs (G+M–) or the presence of both OCGBs and LS-OCMBs (G+M+). G–M– patients had a very low probability of suffering a second attack. By contrast G+M– patients showed a high probability of CDMS, but the risk was higher in G+M+ patients (Table 2). In addition, when exploring the two groups of patients showing OCGBs, it was observed that the G+M+ group had a higher probability of early clinical conversion to MS with respect to G+M– (HR 7.7, 95% confidence interval 2.6–22.7, $P < 0.001$). The median time to the second relapse was analyzed in these three groups: it was only 7 months in G+M+ versus 73 months for G+M– patients (Fig. 1). Moreover, all G+M+ patients developed CDMS after 18 months of follow-up, whilst after 120 months four G+M– patients still remained as CIS (Fig. 1).

Discussion

Some authors have considered ON as a CIS with a benign outcome [4,5]. However, a number of patients presenting with ON may develop MS. Whether different biomarkers useful to identify CIS patients at risk of MS predict early clinical conversion to CDMS after ON was explored. This is important to establish clinical and therapeutic decisions.

Table 1 Demographic, clinical and radiological data

	Converted to CDMS ($N = 25$)	Remaining ON patients ($N = 43$)	P
Age (mean \pm SE)	31.64 ± 2.31	32.72 ± 1.52	0.68
Sex (M/F)	7/18	16/27	0.43
Months to conversion or follow-up (mean \pm SE)	30.88 ± 6.54	55.06 ± 7.53	0.03
Number of T2 lesions (mean \pm SE)	8.91 ± 1.55	3.48 ± 0.87	0.001
Damaged optic nerve (yes/no)	8/13	16/20	0.64
OCGBs (positive/negative)	24/1	15/28	<0.001
LS-OCMBs (positive/negative)	9/16	2/41	0.001
IgG index (mean \pm SE)	0.84 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.01
IgM index (mean \pm SE)	0.17 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.28
Albumin index (mean \pm SE)	4.32 ± 0.35	4.81 ± 0.42	0.42
NFL, ng/l (mean \pm SE)	1052.36 ± 310.33	510.74 ± 134.11	0.07
NFL > 400 ng/l (positive/negative)	8/8	9/17	0.32
NFL > 900 ng/l (positive/negative)	6/10	6/20	0.31

CDMS, clinically definite multiple sclerosis; LS-OCMBs, lipid-specific oligoclonal immunoglobulin M (IgM) bands; M/F, male/female; NFL, neurofilament light protein; OCGBs, oligoclonal immunoglobulin G (IgG) bands; ON, optic neuritis; Months to conversion or follow-up, time to clinical conversion to MS or, in the case of no conversion, time of follow-up.

Table 2 Predictive values of biological and radiological biomarkers

	HR	95% CI	P value	Time to second relapse (months)			
				25%	50%	75%	100%
NFL (ng/l)							
0–399				45	85	–	–
≥400	2.2	0.7–6.1	0.132	15	73	–	–
NFL (ng/l)							
0–899				35	85	–	–
≥900	2.2	0.7–6.3	0.135	15	18	–	–
Abnormal MRI							
0 lesions				–	–	–	–
≥1 lesions	12.5	1.6–93.2	0.013	16	63	–	–
T2 lesions							
0				–	–	–	–
1–3	8.4	0.9–75.8	0.057	45	85	–	–
4–9	14.6	1.8–114.7	0.011	8	63	121	–
≥10	13.4	1.6–108.0	0.014	18	58	–	–
OCGBs							
OCGB–				–	–	–	–
OCGB+	21.3	2.8–158.3	0.003	8	40	121	–
OCBs							
G–M–				–	–	–	–
G+M–	15.0	1.9–113.8	0.009	32	73	–	–
G+M+	116.6	13.4–1013.5	<0.001	5	7	18	18

CI, confidence interval; G–M–, absence of both oligoclonal IgG bands (OCGBs) and lipid-specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMBs); G+M–, only the presence of OCGBs; G+M+, the presence of both OCGBs and LS-OCMBs; HR, hazard ratio; MRI, magnetic resonance imaging; NFL, neurofilament light protein; OCBs, oligoclonal bands; OCGBs, oligoclonal IgG bands.

Routine MRI images were assessed and CSF studies were easily implemented in clinical laboratories. CSF NFL values were examined first. NFL is considered as a biomarker of axonal damage and is associated with conversion to MS in general CIS cohorts [11]. In our ON series, CSF NFL levels seemed to be higher in patients who converted to CDMS, although differences were not significant. When assessed in other series with longer follow-up,

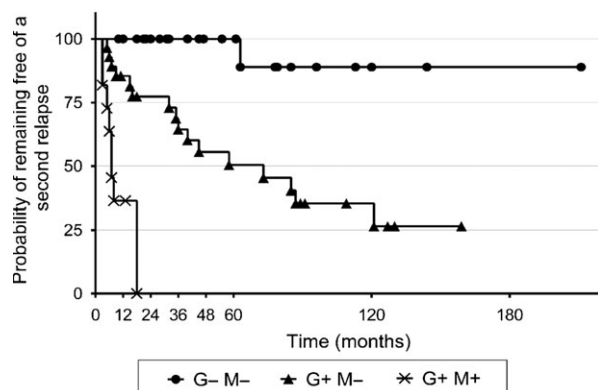


Figure 1 Probability of clinical conversion to multiple sclerosis of optic neuritis patients according to oligoclonal bands. G–M–, absence of both oligoclonal IgG bands (OCGBs) and lipid-specific oligoclonal IgM bands (LS-OCMBs); G+M–, presence of only OCGBs; G+M+, presence of both OCGBs and LS-OCMBs.

NFL levels predicted earlier conversion in univariate tests, but this could not be confirmed in multivariate analyses [13]. Further studies in larger cohorts are necessary to assess the value of NFL in predicting early conversion of ON patients.

Magnetic resonance imaging data were next explored. The Optic Neuritis Study Group showed that having one or more T2 lesions at ON onset increases the risk of conversion to MS [2]. A correlation was found between having MRI lesions and the risk of a second relapse, but when the data were stratified according to lesion number a significant correlation was only found with CDMS patients with more than three T2 lesions. This agrees with previous findings showing that having more than two T2 lesions increases MS risk in ON patients [19]. However, despite previous findings in other CIS cohorts [5] a further increase in the risk of conversion was not found in patients showing 10 or more lesions. This could be due to the low proportion of patients with a high number of T2 lesions present in our ON cohort. It was about half of that found in general CIS cohorts [5], thus confirming previous observations indicating a lower number of lesions in ON patients [4]. These data confirm the value of T2 lesions as a prognostic marker of ON conversion to MS, but indicate that prognostic markers described in general CIS cohorts may not have the same predictive values in different CIS topographies.

Finally oligoclonal bands were studied. Previous reports showed discordant results on this issue [9,19,20], probably due to methodological issues. A highly sensitive test for OCGB detection [10] was used and it confirmed that OCGBs predict clinical conversion to MS. Although our series showed a lower percentage of patients with LS-OCMBs than general CIS cohorts [10], these antibodies strongly associated with early conversion to MS.

The weakness of this study may be the shorter follow-up compared to other cohorts [13], which prevented the value of NFL in predicting patient outcome being clearly demonstrated. However, our results strengthen the value of IgG and IgM oligoclonal bands in ON prognosis and confirm the role of MRI in predicting clinical conversion to MS.

In summary, our data confirm the value of MRI and OCGB studies to predict clinical conversion to MS after an ON episode. They also demonstrate that LS-OCMBs clearly associate with the early appearance of a second relapse. Although these data should be validated in a larger cohort, our data suggest that these antibodies identify, at ON onset, patients with high risk of early conversion to CDMS.

Acknowledgements

This work was supported by grants PI15/00513 and RD16/0015/0001 from the Fondo para la Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and FEDER.

Disclosure of conflict of interest




Drs Tejeda Velarde, Carrasco Sayalero, Espiño, Picón, Toboso, Walo, Lourido Garcia and Muriel have nothing to disclose. Dr Costa Frossard reports personal fees from Genzyme, Biogen Idec, Bayer, Novartis and Roche Pharma outside the submitted work; Dr Sainz de la Maza reports personal fees from Sanofi Genzyme, Biogen Idec and Roche outside the submitted work. Dr Alvarez-Cermeño reports personal fees from Genzyme and Merck-Serono, and grants and personal fees from Biogen Idec, outside the submitted work. Dr Villar reports grants and personal fees from Genzyme and Biogen Idec, and personal fees from Novartis, Roche Pharma and Merck-Serono, outside the submitted work.

References

- Hoorbakht H, Bagherkashi F. Optic neuritis, its differential diagnosis and management. *Open Ophthalmol J* 2012; **6**: 65–72.
- Optic Neuritis Study Group. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch Neurol* 2008; **65**: 727–732.
- Costello F. Vision disturbances in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2016; **36**: 185–195.
- Tintoré M, Rovira A, Río J, *et al*. Is optic neuritis more benign than other first attacks in multiple sclerosis? *Ann Neurol* 2005; **57**: 210–215.
- Tintore M, Rovira À, Río J, *et al*. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 2015; **138**: 1863–1874.
- Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, *et al*. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; **343**: 898–904.
- Comi G, Filippi M, Barkhof F, *et al*. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001; **357**: 1576–1582.
- Soderstrom M, Ya-Ping J, Hillert J, Link H. Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology* 1998; **50**: 708–714.
- Skov AG, Skov T, Frederiksen JL. Oligoclonal bands predict multiple sclerosis after optic neuritis: a literature survey. *Mult Scler* 2011; **17**: 404–410.
- Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, *et al*. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005; **115**: 187–194.
- Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, *et al*. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology* 2016; **87**: 1076–1084.
- Modvig S, Degn M, Sander B, *et al*. Cerebrospinal fluid neurofilament light chain levels predict visual outcome after optic neuritis. *Mult Scler* 2016; **22**: 590–598.
- Modvig S, Degn M, Roed H, *et al*. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Mult Scler* 2015; **21**: 1761–1770.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, *et al*. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; **69**: 292–302.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, *et al*. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; **13**: 227–231.
- Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Garcia-Barragan N, *et al*. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006; **66**: 576–578.
- Byrne LM, Rodrigues FB, Blennow K, *et al*. Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol* 2017; **16**: 601–609.
- Villar LM, Picón C, Costa-Frossard L, *et al*. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2015; **22**: 1169–1175.
- Ghezzi A, Martinelli V, Rodegher M, Zaffaroni M, Comi G. The prognosis of idiopathic optic neuritis. *Neurol Sci* 2000; **21**(4 Suppl. 2): S865–S869.
- Ghezzi A, Torri V, Zaffaroni M. Isolated optic neuritis and its prognosis for multiple sclerosis: a clinical and paraclinical study with evoked potentials. CSF examination and brain MRI. *Ital J Neurol Sci* 1996; **17**: 325–332.

RESEARCH ARTICLE

Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients

Silvia Medina^{1,2}, Susana Sainz de la Maza^{2,3}, Noelia Villarrubia^{1,2}, Roberto Álvarez-Lafuente^{2,4} , Lucienne Costa-Frossard^{2,3}, Rafael Arroyo^{2,5}, Enric Monreal^{2,3}, Amalia Tejeda-Velarde^{1,2} , Eulalia Rodríguez-Martín^{1,2}, Ernesto Roldán^{1,2}, José C. Álvarez-Cermeño^{2,3} & Luisa M. Villar^{1,2} 

¹Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain

²The Spanish Network of Multiple Sclerosis (REEM), Spain

³Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, Spain

⁴Department of Neurology, Hospital Clínico San Carlos, IDISSC, Madrid, Spain

⁵Department of Neurology, Hospital Universitario Quirónsalud Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Luisa M. Villar, Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Km. 9.100, 28034 Madrid, Spain. Tel: +34913368795; Fax: +34913368809; E-mail: luisamaria.villar@salud.madrid.org

Funding information

This work was supported by grants FIS-PI15/00513 and RD16/0015/0001 from the Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad, Spain and FEDER funds.

Received: 5 June 2018; Revised: 16 November 2018; Accepted: 26 November 2018

doi: 10.1002/acn3.711

Abstract

Objectives: Teriflunomide, a disease-modifying treatment approved for multiple sclerosis (MS), inhibits reversibly dihydroorotate dehydrogenase, an enzyme involved in de novo pyrimidine biosynthesis and down-regulates proliferation of activated lymphocytes. We aimed to study the impact of this drug in the lymphocyte profiles of MS patients. **Methods:** Fifty-five patients with relapsing-remitting MS who initiated teriflunomide treatment were included in the study. We studied peripheral blood mononuclear cells obtained before and 6 months after treatment initiation and explored effector, memory, and regulatory cells by flow cytometry. Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6 months after treatment results. *P*-values were corrected with Bonferroni test. **Results:** When explored T and B cell subsets, we observed a decrease in the percentages of terminally differentiated CD4⁺ T cells (*P* = 0.001) and plasmablasts (*P* < 0.0001) after 6 months of treatment. These results were confirmed with the total cell number. When studied immunomodulatory cells, we observed a clear increase of monocytes expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) (*P* = 0.005), which correlated negatively with all effector CD8⁺ T cell subsets. We also observed an increase in the percentage of CD8⁺ T cells (*P* = 0.028) and monocytes (*P* = 0.04) producing IL-10. **Conclusions:** Teriflunomide induces a specific reduction in effector T and B cells that have shown to play a role in MS course and an increase in immunomodulatory cells. Particularly, this drug induces the expression of PD-L1, a molecule involved in tolerance to autoantigens, which can contribute to inhibit the abnormal immune response taking place in MS.

Introduction

Teriflunomide (Aubagio[®]) is an oral immunomodulatory disease-modifying therapy recently approved for the treatment of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS).¹ Its efficacy and safety have been demonstrated in several phase III clinical trials including TEMSO,^{2,3} TOWER,⁴ and TENERE.⁵ It produces a significant reduction in the relapse rate, disability progression, and the appearance of new lesions in magnetic resonance imaging when compared with placebo.

Teriflunomide induces a reversible inhibition of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a mitochondrial enzyme specifically required for de novo pyrimidine biosynthesis and particularly active in proliferating cells such as a lymphocytes.⁶ Although its therapeutic mode of action is not fully elucidated yet, it has been proposed that this drug produce a selective reduction of proliferating T and B cells.¹

Inhibition of adhesion molecules, cytokines, protein tyrosine kinases, nuclear factor-κB (NF-κB) activation, and cyclooxygenase 2 activity have also been demonstrated in

some *in vitro* studies, suggesting that teriflunomide may also impact signal transduction, migration, and inflammatory processes.^{7,8}

However, the effect of teriflunomide on the immune cell profile is not fully understood. The main goal of this study was to identify if teriflunomide induces specific changes in blood immune cells of multiple sclerosis (MS) patients to further understand the effect of the drug in the abnormal inflammatory response taking place in MS.

Methods

Patients

We studied 55 patients diagnosed with RRMS who consecutively initiated treatment with teriflunomide at the MS unit of Ramon y Cajal University Hospital and Clínico San Carlos Hospital (Madrid, Spain).

This study was approved by the ethics committees of both hospitals. Each patient signed a written consent before entry. Baseline characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1.

Samples

Samples were collected immediately before initiating treatment with teriflunomide and 6 months after. Heparinized whole blood was collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained within 2 h by Ficoll density gradient centrifugation (Fresenius Kabi, Norway) and cryopreserved in aliquots of 5–6 × 10⁶ cells until studied. Blood absolute leukocyte counts were also examined at baseline and 6 months after in fresh blood samples.

Table 1. Baseline characteristics of study population (*n* = 55).

Clinical and epidemiological variables	Results
Age at baseline (years) (M ± SE)	44.7 ± 1.3
Sex (male/female)	14/41
Disease duration (months) (M ± SE)	155.1 ± 25.5
EDSS score at baseline (M ± SE)	2.4 ± 0.3
Relapses in the 2 years before treatment (M ± SE)	0.8 ± 0.1
Previous treatments	13 N; 35 FL; 7 SL
Number of previous treatments	13(N); 27(1); 7(2); 8(≥3)
Washout period (months) (M ± SE)	8.5 ± 2.3

FL: prior treatment with first line drugs; M ± SE, Mean ± Standard error; N, no previous disease-modifying treatment; SL, prior treatment with second-line drugs; (1): Prior treatment with one disease-modifying drug; (2): prior treatment with two disease-modifying drugs; (≥3): prior treatment with three or more drugs.

Monoclonal antibodies

The following monoclonal antibodies were used in the study: CD8-FITC, CD27-FITC, Interferon (IFN)-gamma-FITC, CD24-PE, CD80-PE, CD197-PE (CCR7-PE), CD3-PerCP, CD38-PE-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD25-PE-Cy7, programmed death-ligand 1 (PD-L1)-PE-Cy7, TNF-alpha-PerCP-Cy5.5, CD45RO-APC, CD56-APC, HLA-DR-APC, CD4-APC-H7, CD8-APC-H7, CD14-APC-H7, CD3-BV421, CD69-BV421, CD127-BV421, CD45-V500 (all from BD Biosciences, San Diego, CA); interleukin (IL)-10-PE (Biolegend, San Diego, CA), and IL-17-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Labeling of surface antigens

Aliquots of 10⁶ PBMC were resuspended in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), stained with the appropriate amounts of monoclonal antibodies during 30 min at 4°C in the dark, washed twice with PBS and analyzed.

In vitro stimulation and intracellular cytokine staining

Aliquots of 10⁶ PBMC were resuspended in 1 mL of Complete Medium with 50 ng/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 750 ng/mL Ionomycin (Sigma-Aldrich) in presence of 2 µg/mL Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) and 2.1 µmol/L Monensin (GolgiStop, BD Biosciences) in polypropylene tubes, and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. To identify IL-10-producing B cells, PBMC were preincubated with 3 µg/mL of CpG oligonucleotide (Invi-vogen, San Diego, CA) during 20 h at 37°C with 5% CO₂ prior to stimulation. After incubation, PBMC were washed with PBS and stained for 30 min at 4°C in the dark with appropriate amounts of monoclonal antibodies recognizing the surface antigens. Then, cells were washed with PBS, fixed, and permeabilized for 20 min at 4°C in the dark with Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences), washed twice with Perm/Wash solution (BD Biosciences), and stained intracellularly 30 min at 4°C in the dark with monoclonal antibodies recognizing the following cytokines: IFN-gamma, TNF-alpha, IL-17, and IL-10. After two washes, PBMC were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

Flow cytometry

Cells were always analyzed within a maximum period of 1 h after staining. Mean autofluorescence values were set using appropriate negative isotype controls. Data analysis

was performed using FACSDiva Software V.8.0 (BD Biosciences). A gate including lymphocytes and monocytes and excluding debris and apoptotic cells was established; a minimum amount of 30,000 events were analyzed. Gating strategy to identify the different leukocyte populations is shown in Figure S1 (S1). In addition, we followed the strategy detailed below to identify the different subpopulations. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were classified as: naïve (CCR7⁺ CD45RO[−]); central memory (CM) (CCR7⁺ CD45RO⁺); effector memory (EM) (CCR7[−] CD45RO⁺); terminally differentiated (TD) (CCR7[−] CD45RO[−]). Regulatory CD4 T cells (Treg) were defined as CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low}. B cells were classified as: memory (CD19⁺ CD27^{dim} CD38^{dim}), plasmablasts (CD19⁺ CD27^{hi} CD38^{hi}); and regulatory B cells were classified as CD19⁺ CD27[−] CD24^{hi} CD38^{hi} cells (Breg) or CD19⁺ IL-10⁺ cells. PD-L1 was explored in monocytes by studying its coexpression with CD14 in PBMC. Costimulatory and activation markers expression were analyzed on monocytes (CD80, HLA-DR), and on CD4⁺ and CD8⁺ T cells (CD69, HLA-DR).

For intracellular cytokine staining, nonstimulated PBMC and appropriate isotype controls were used. We explored intracellular production of IFN- γ and TNF- α , IL-17 and IL-10 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Intracellular IL-10 production was also assessed in CD19⁺ B cells and monocytes.

Proliferation assay

Aliquots of 10⁶ PBMC were incubated in the presence or absence of 4 μ g of anti-PD-L1 neutralizing antibody (e-Biosciences, San Diego, CA) during 4 h at 37°C with 5% CO₂. Then cells were stimulated with 1 μ g/mL of purified anti-CD3 antibody (BD Biosciences) during 72 h. CD4⁺ T cell proliferation was quantified using the BD Pharmin-gen BrdU flow kit (BD Biosciences). Briefly, cells were incubated with 3 mmol/L BrdU during 18 h, washed in saline, and stained with the appropriate amount of monoclonal antibodies for identifying CD4⁺ T cell subsets, as described above. After washing, cells were fixed and permeabilized, incubated with 30 μ g of DNase, stained with an anti-BrdU-FITC antibody, and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Statistical analyses were made using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Prism Inc, La Jolla, CA). Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6 months after treatment results. Mann–Whitney test was used to compare different groups of patients. *P*-values were corrected using Bonferroni method.

Correlations were assessed by a Spearman test. *P*-values below 0.05 were considered as significant.

Results

Fifty-five patients (14 male and 41 female) treated with teriflunomide for at least 6 months were included in the study. Baseline characteristics are shown in Table 1.

Age at treatment initiation was 44.7 \pm 1.3 (Mean \pm standard error) years and disease duration was 155.1 \pm 25.5 months. Annualized relapse rate in the previous 12 months was 0.8 \pm 0.1 and the EDSS score at baseline was 2.4 \pm 0.3. Thirteen patients were treatment naïve, 35 previously received first-line drugs (interferon- β , glatiramer acetate, or dimethyl fumarate), and seven second-line drugs (natalizumab, fingolimod, or azathioprine). Twenty-seven patients were previously treated with only one disease-modifying drug; seven with two, and eight with three or more. Patients who received previous treatments underwent a minimum washout period of a month before initiating teriflunomide treatment (Median = 3.0 months, 25%–75% IQR: 1.0–6.0 months).

Effector and immunomodulatory subsets

We explored the changes induced by teriflunomide in blood mononuclear cell counts after 6 months of treatment. Patients experienced a discrete decrease in the absolute lymphocyte counts (1908 \pm 89.9 vs. 1754 \pm 10.1; *P* < 0.0001). No patient developed lymphopenia during follow-up. We further addressed the impact of this drug on the percentages of different leukocyte subsets (Table 2 and Fig. 1). To avoid inconclusive results, we applied Bonferroni correction to all comparisons.

We first explored naïve, memory, and effector CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. Teriflunomide induced a clear decrease on TD CD4⁺ T cells after 6 months of treatment (*P* = 0.001). In addition, we explored the percentages of effector and memory B cell subsets. The only difference observed after 6 months of teriflunomide treatment was a consistent decrease of plasmablasts (*P* < 0.0001). Representative dot plots are shown in Figure 2.

When evaluated IFN- γ , TNF- α and IL-17 intracellular cytokine production by CD4 and CD8⁺ T cells, we did not find significant differences between basal and 6 months samples (data not shown).

We next studied the effect of teriflunomide in the regulatory subsets (Table 2). We found a discrete increase of monocytes (*P* = 0.044) and of CD8⁺ T cells (*P* = 0.028) producing IL-10 (Fig. 3).

We additionally explored monocytes expressing PD-L1⁺, which have shown to modulate adaptive immune

Table 2. Teriflunomide induced changes in leukocyte blood subsets.

		Percentages			Absolute numbers		
		Basal (M ± SE)	6 months (M ± SE)	P	Basal (M ± SE)	6 months (M ± SE)	P
Total patients (n = 55)							
Effector and memory subsets	CD4+T cells	34.8 ± 1.4	38.6 ± 1.5	NS			
	Naïve	21.2 ± 1.3	20.4 ± 1.3	NS			
	Central memory	9.2 ± 0.4	9.9 ± 0.5	NS			
	Effector memory	6.3 ± 0.3	6.5 ± 0.4	NS			
	Terminally differentiated	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.001	50.2 ± 4.8	42.3 ± 4.7	P < 0.0001
	CD8+T cells	14.2 ± 0.7	13.3 ± 0.9	NS			
	Naïve	5.3 ± 0.4	5.0 ± 0.5	NS			
	Central memory	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.1	NS			
	Effector memory	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	NS			
	Terminally differentiated	5.9 ± 0.7	5.2 ± 0.5	NS			
	NKT cells	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.5	NS			
	NK cells	10.1 ± 0.7	9.1 ± 0.8	NS			
	CD19+ B cells	10.1 ± 0.7	10.5 ± 0.9	NS			
	Memory B cells	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	NS			
	Plasmablasts	0.1 ± 0.01	0.05 ± 0.005	<0.0001	2.7 ± 0.3	1.2 ± 0.1	P < 0.0001
	Monocytes	18.3 ± 1.1	20.1 ± 1.4	NS			
Immunomodulatory subsets	Treg	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	NS			
	Breg	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	NS			
	CD56 ^{bright}	0.99 ± 0.1	1.15 ± 0.1	NS			
	PD-L1+ Monocytes	0.3 ± 0.04	0.6 ± 0.1	0.005	21.5 ± 2.5	33.8 ± 5.4	P = 0.01
	CD4+ IL-10+	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02	NS			
	CD8+ IL-10+	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.028	3.2 ± 0.3	4.0 ± 0.5	NS
	CD19+ IL-10+	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	NS			
	IL-10+ Monocytes	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.044	3.7 ± 0.7	5.3 ± 1.1	NS

Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells and as absolute numbers (cells/ μ L). *P*-values were corrected using Bonferroni method. Bmem, memory B cells; Breg, CD27- regulatory B cells; IL, interleukin; M ± SEM, Mean ± Standard error of mean; NK, natural killer cells; NKT, natural killer T cells; NS, not significant; PB, plasmablasts; PD-L1, programmed death-ligand 1; Treg, regulatory T cells.

responses.^{9,10} We observed a clear increase after 6 months of treatment (*P* = 0.005, Figs. 1 and 3).

We next studied if previous treatments could introduce a bias in our results by analyzing differences in basal values of the different leukocyte subsets between naïve (*n* = 13) and previously treated patients (*n* = 42). We did not find any significant differences (data not shown). We also analyzed differences between basal and 6 month samples excluding the seven patients receiving second-line drugs prior to teriflunomide. The results did not change substantially. TD CD4+ T cells, and plasmablasts decreased during teriflunomide treatment and PD-L1+ monocytes increased (*P* < 0.001 in all cases).

We explored if significant data also corresponded with variations in the total cell numbers. Our results confirmed the decrease of TD CD4+ T cells (50.2 ± 4.8 cells/mL vs. 42.3 ± 4.7 cells/mL; *P* < 0.0001) and plasmablasts (2.7 ± 0.3 cells/mL vs. 1.2 ± 0.1 cells/mL; *P* < 0.0001). We also confirmed the increase of PD-L1+ monocytes (21.5 ± 2.5 cells/mL vs. 33.8 ± 5.4 cells/mL; *P* = 0.01). Results are shown in Table 2 and Figure 1.

Effect in costimulatory and activation markers and on CD4+ T cell proliferation

To deepen into the effect of teriflunomide in immune cells, we also explored costimulatory and activation molecules in monocytes and T lymphocytes of seven of the studied patients, before and after 6 months of teriflunomide treatment. No differences were observed in CD80 and HLA-DR expression by monocytes or in HLA-DR expression in T cells, but a clear decrease in mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 was found in CD4+ T cells after treatment (*P* = 0.03, Fig. 4).

As PD-L1 acts as an immunomodulatory receptor, we investigated if this molecule could have an influence in the reduction of TD CD4+ T cells. We studied this in PBMC of seven MS patients obtained prior to initiating teriflunomide treatment. Cells were stimulated with anti-CD3, in the presence or absence of a neutralizing anti-PD-L1 antibody. Proliferation of the different T cell subsets was explored. We found higher percentages of proliferating TD CD4+ T cells when incubated with anti-PD-L1 antibody (Median = 30.3;

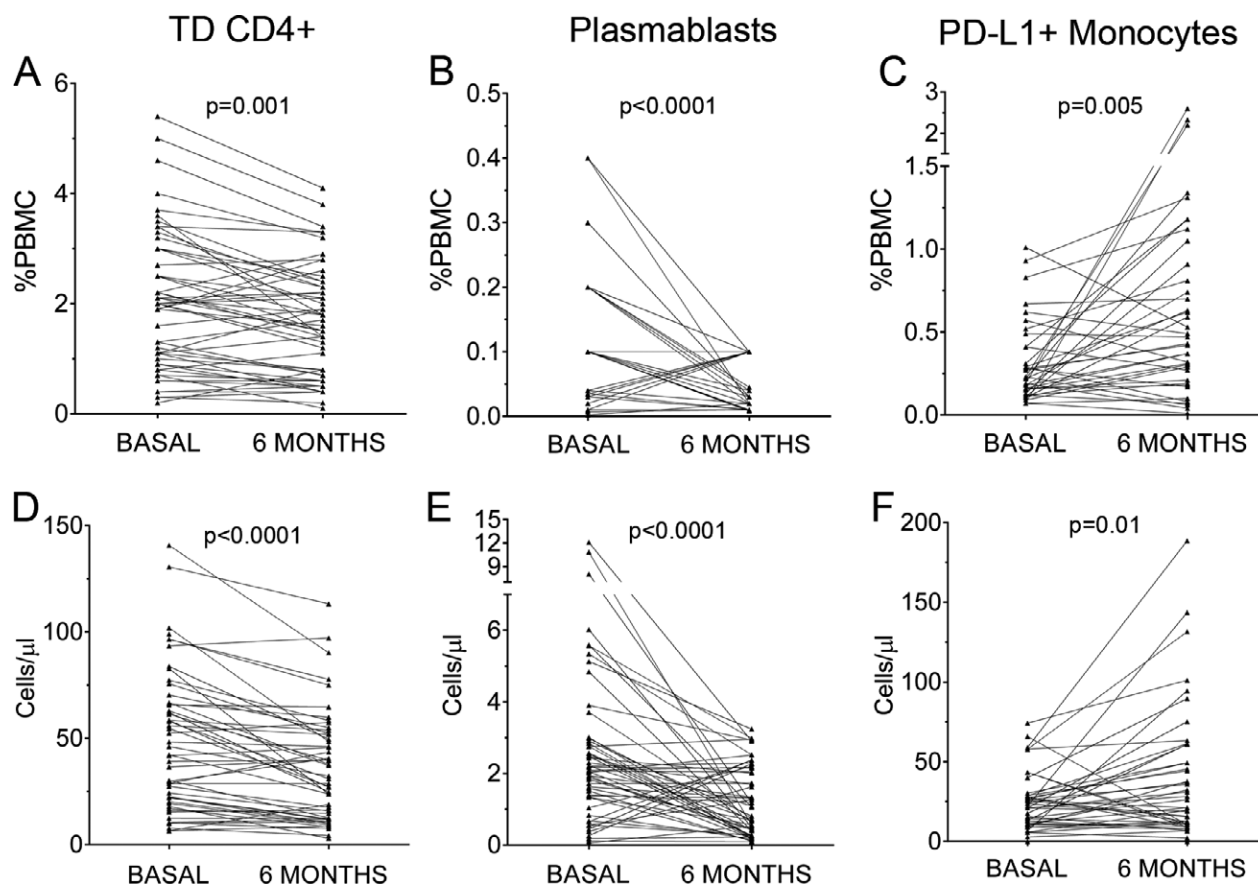


Figure 1. Percentages (A, B, C) and absolute cell counts (D, E, F) of terminally differentiated (TD) CD4+ T cells (A, D), plasmablasts (B, E) and PD-L1+ monocytes (C, F) obtained before (basal) and at 6 months of teriflunomide treatment ($n = 55$). Percentages are referred to total peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

25%–75% IQR: 15.4–43.0) than in control samples (Median = 21.4; 25%–75% IQR: 14.1–35.6; $P = 0.03$).

Association between immunomodulatory and effector populations

We explored the putative correlation between immunomodulatory and effector subsets after 6 months of treatment. There was a positive correlation within the percentage of CD8+ IL-10+ T cells and those of CD4+ IL-10+ T cells ($r = 0.44$, $P = 0.01$) and CD19+ IL-10+ B cells ($r = 0.53$, $P < 0.0001$). We also found modest negative correlations between PD-L1+ monocytes and the effector CD8+ T cells. The ratios (r) were: -0.37 for CM cells ($P = 0.01$), -0.39 for EM ones ($P = 0.01$), and -0.36 for TD subset ($P = 0.02$). Results are shown in Figure 5.

Discussion

Teriflunomide is an inhibitor of DHODH that ameliorates multiple sclerosis course by reducing activation-

induced proliferation of lymphocytes, which is highly dependent on the de novo pyrimidine synthesis.⁶ It is the active metabolite of leflunomide, a disease-modifying antirheumatic drug. However, the changes in the different immune cell subsets induced by this treatment have not been totally identified yet. Most works were made with leflunomide in vitro and in animal models. This molecule causes cell cycle arrest in early S phase without inducing apoptosis,¹¹ impedes formation of the immune synapses,¹² and decreases the release of Th1 cytokines.^{13,14} In vitro studies also showed that teriflunomide inhibits lymphocyte proliferation, without inducing cytotoxicity and significantly decreased the release of proinflammatory cytokines from activated monocytes.⁸

Less is known on teriflunomide-induced changes in lymphocyte profiles of MS patients. In a small cohort of seven RRMS patients, it was described a reduction in the number of total, mature and regulatory B cells.¹⁵

In this work we deepened into the mechanism of action of teriflunomide by studying a wider array of leukocytes including different T, B, and monocyte

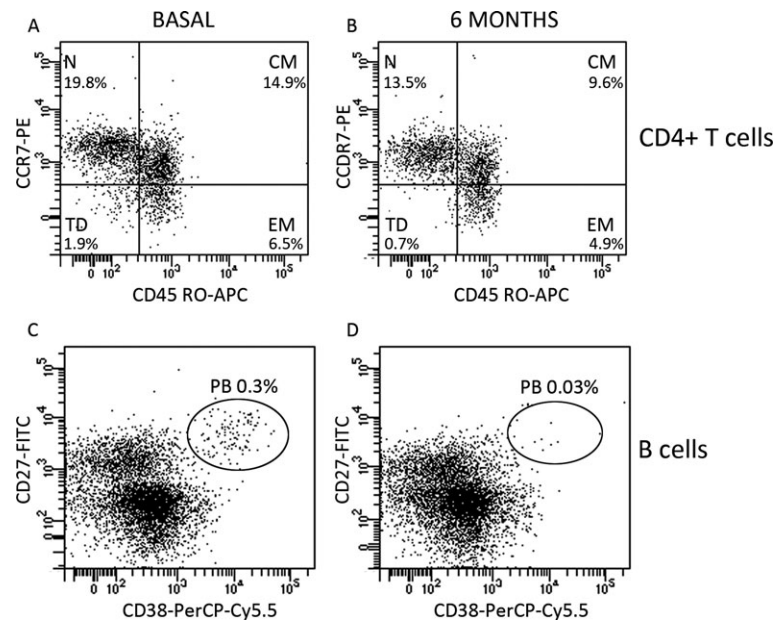


Figure 2. Dot plots showing CD4+ T cells (A and B) and B cells (C and D) at basal state (A and C) and after 6 months of treatment (B and D). Plots are gated on CD4 T cells (A and B) and B cells (C and D). Naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM) and terminally differentiated cells (TD) were studied according to their differential membrane expression of CD197 (CCR7) and CD45RO. Plasmablasts (PB) were studied according to their differential membrane expression of CD27 and CD38. Percentages showed in the plots are referred to total peripheral blood mononuclear cells.

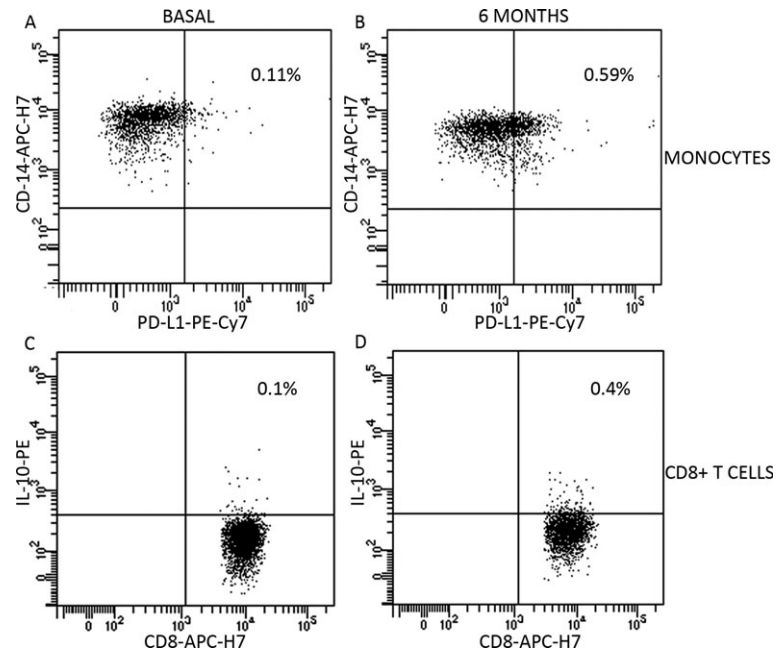


Figure 3. Dot plots showing membrane expression of PD-L1 on monocytes (A and B) and intracellular expression of IL-10 on CD8+ T cells (C and D) at basal state (A and C) and after 6 months of treatment (B and D). A and B plots are gated on monocytes (CD14+ cells); C and D plots are gated on CD8+ T cells. Percentages are referred to total peripheral blood mononuclear cells.

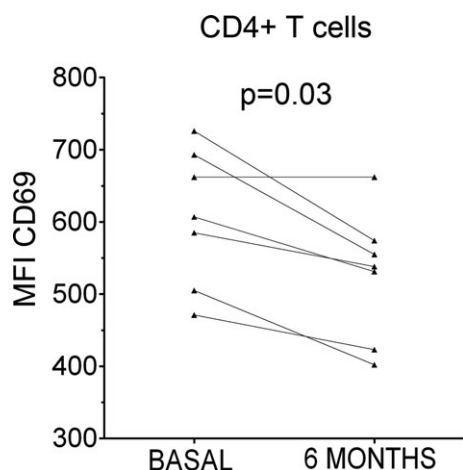


Figure 4. Expression of CD69 on CD4+ T cells. We observed that CD69 expression on CD4+ T cells measured as the mean fluorescence intensity (MFI) is reduced after 6 months of teriflunomide treatment (6 months) when compared with results of samples obtained before treatment (basal) ($n = 7$).

subsets in a cohort of 55 RRMS treated with teriflunomide. We explored changes induced by this treatment by comparing results obtained in basal and 6 month

samples. First we observed that teriflunomide treatment induces a significant decrease in the percentages and total cell counts of TD CD4+ T cells and in plasmablasts. Terminally differentiated T cells are home to peripheral tissue where they pursue their effector functions such as secretion of proinflammatory cytokines.¹⁶ In addition, the percentage of plasmablasts, a highly differentiated, antibody secreting B cell subset, is elevated in the blood of MS patients since the first clinical presentation of the disease and correlates with disease activity.¹⁷ The decrease of both effector cell subsets under teriflunomide treatment may contribute to the beneficial effect of the drug.

We did not find changes in Th1 and Th17 cytokines upon teriflunomide treatment. The main effect of this drug is observed in TD CD4+ T cells, which represent normally less than 10% of total CD4+ T cells. This may be a reason by which these differences are not appreciated. However, TD cells are important, since they are the main cells migrating to inflamed tissues upon inflammation.¹⁶

Other data indicating the effect of teriflunomide in T cell activation is the decrease induced by this treatment in

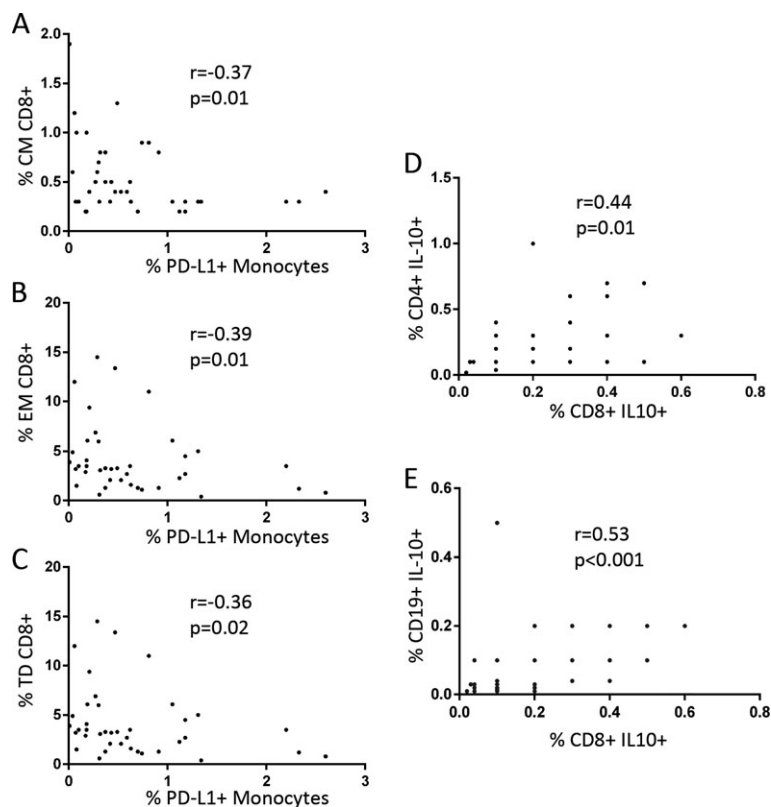


Figure 5. PD-L1+ monocytes show negative correlation with central memory (CM, A), effector memory (EM, B) and terminally differentiated (TD, C) CD8+ T cells. CD8+ IL10+ T cells correlate positively with CD4+ IL10+ T cells (D) and CD19+ IL10+ B cells (E).

the expression of CD69, which is up-regulated by CD4+ T cells upon activation.¹⁸

When studied immunomodulatory populations, we observed an increase in the percentages of CD8+ T cells and monocytes producing IL-10 after 6 months of treatment. Our results agree with *in vitro* results obtained with leflunomide, an analog of this drug, which showed an increase in IL-10 production by T lymphocytes.¹³ Interestingly, the values of CD8+ IL-10+ T cells correlated in 6 month samples with that of monocytes and CD19+ cells producing IL-10, which suggests that this drug can induce a bias toward a tolerogenic response.

In addition, we observed an increase in monocytes expressing PD-L1+. PD-L1 is a ligand of PD-1, a cell surface receptor with an important role in down-regulating the immune system and promoting self-tolerance by suppressing T cell inflammatory activity.⁹ The interaction between PD-1/PD-L1 induce inhibition of T cell proliferation, cytokine production, and cytolytic activity.¹⁰ PD-1-deficient animals develop diverse autoimmune conditions^{19,20} and its blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis model increase disease severity.^{21,22} PD-1/PD-L1 axis represents a checkpoint to control immune responses and its up-regulation in monocytes can be important to modulate the abnormal response in MS.

In our series, PD-L1 overexpression could contribute to down-modulate TD CD4+ T cells. When incubated PBMC of our patients with anti-PD-L1 neutralizing antibodies, we observed an increase in the proliferation of these cells.

In junction, our results support previous data describing that MS may associate with defective T regulatory responses and that up-regulation of these cell subsets may associate with a more benign disease course.^{23,24}

The main limitation of our study was the low number of treatment naïve patients ($n = 13$). Patients were consecutively recruited, thus reflecting real life data in our setting. However, we ruled out the putative effects of prior treatments by excluding patients treated with second-line drugs from the analysis and by comparing basal data of patients receiving or not receiving previous treatments. These analyses showed that our data did not change substantially with prior treatments, probably due to the washout period.

In summary, we observed that teriflunomide induces a shift in the abnormal response taking place in MS. It targets specifically terminally differentiated cells and induces a regulatory status in the innate immune response. These data contribute to ascertain the mechanism of action of this drug.

Author Contributions

SM, NV, and ATV collected and stored blood samples and performed the experiments. SM wrote the manuscript

draft. ERM, and ER supervised flow cytometry studies. RAL, RA, SSM, LCF, EM and JCAC visited MS patients and collected clinical data. All authors read and approved the final manuscript. LMV designed and supervised the study and corrected the manuscript.

Acknowledgments

Authors acknowledge MA Fernández de Pablos and S Ortega for their excellent technical support and A Muriel for his help with the statistical analyses. This work was supported by grants FIS-PI15/00513 and RD16/0015/0001 from the Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad, Spain and FEDER funds.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Bar-Or A. Teriflunomide (Aubagio®) for the treatment of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2014;262:57–65.
2. Miller AE, O'Connor P, Wolinsky JS, et al. Teriflunomide Multiple Sclerosis Trial Group. Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMSO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:1625–1632.
3. Wolinsky JS, Narayana PA, Nelson F, et al. Magnetic resonance imaging outcomes from phase III trials of teriflunomide. *Mult Scler* 2013;19:1310–1319.
4. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2014;13:247–256.
5. Vermersch P, Czonkowska A, Grimaldi LM, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler* 2014;20:705–716.
6. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 2014;74:659–674.
7. Fragoso YD, Brooks JB. Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015;8:315–320.
8. Li L, Liu J, Delohery T, et al. The effects of teriflunomide on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *J Neuroimmunol* 2013;265:82–90.
9. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:203–220.

10. Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002;32:634–643.
11. Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, et al. The immunomodulatory drug leflunomide inhibits cell cycle progression of B-CLL cells. *Leukemia* 2008;22:635–638.
12. Zeyda M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. Disruption of the interaction of T cells with antigen-presenting cells by the active leflunomide metabolite teriflunomide: involvement of impaired integrin activation and immunologic synapse formation. *Arthritis Rheum* 2005;52:2730–2739.
13. Korn T, Magnus T, Toyka K, Jung S. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide-mechanisms independent of pyrimidine depletion. *J Leukoc Biol* 2004;76:950–960.
14. Dimitrova P, Skapenko A, Herrmann ML, et al. Restriction of de novo pyrimidine biosynthesis inhibits Th1 cell activation and promotes Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2002;169:3392–3399.
15. Gandoglia I, Ivaldi F, Laroni A, et al. Teriflunomide treatment reduces B cells in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017;4:e403. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000403>.
16. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, et al. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43:2797–2809.
17. Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, et al. Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 2017;133:43–60.
18. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005;26:136–140.
19. Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11:141–1517.
20. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001;291:319–322.
21. Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, et al. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2007;182:124–134.
22. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, et al. Critical role of the Programmed Death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2003;198:71–78.
23. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:625–638.
24. Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, et al. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 2011;186:3317–3326.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Representative gating strategy for flow cytometry analysis.



Factors associated with dimethyl fumarate-induced lymphopenia

Susana Sainz de la Maza^{a,*,1}, Silvia Medina^{b,1}, Noelia Villarrubia^b, Lucienne Costa-Frossard^a, Enric Monreal^a, Amalia Tejeda-Velarde^b, Eulalia Rodríguez-Martín^b, Ernesto Roldán^b, José C. Álvarez-Cermeño^{a,c,2}, Luisa M. Villar^{b,2}

^a Department of Neurology, IRYCIS, REEM, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^b Department of Immunology, IRYCIS, REEM, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^c Department of Medicine, University of Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Multiple sclerosis
Dimethyl fumarate
Risk factors
Lymphopenia
Lymphocyte subsets

ABSTRACT

Background: Lymphopenia is a major concern in MS patients treated with dimethyl-fumarate (DMF) as it increases the risk of progressive multifocal leukoencephalopathy.

Objective: To identify factors associated with lymphopenia in DMF-treated patients and explore changes in blood lymphocyte subsets associated with DMF-induced lymphopenia.

Methods: Prospective longitudinal study including 106 patients initiating DMF treatment followed for a median time of 24.67 months. Blood lymphocyte subsets were studied in 64 patients by flow cytometry at baseline and 6 months after.

Results: Mean absolute lymphocyte counts (ALCs) decreased by 29% during the first year of DMF-treatment. Patients developing lymphopenia showed a faster decline within the three first months. A reduction of ALCs higher than 38% at this time was associated to subsequent development of grade 2–3 lymphopenia (OR = 5.93, 95% CI: 1.9–18.6, $p = 0.002$). All patients showed a significant decrease in different T and B lymphocyte subsets upon DMF therapy. In addition, lymphopenic patients experienced a selective decrease in natural killer T (NKT) cell percentages ($p = 0.01$), and a high drop in NKT total counts ($p < 0.0001$).

Conclusions: Patients who experience a drop in ALCs by $> 38\%$ at three months of DMF-treatment are about 6-times more likely to develop significant lymphopenia. This decrease is clearly associated with a considerable loss of NKT cells.

1. Introduction

Dimethyl fumarate (DMF; Tecfidera, Biogen, Weston, MA) is an oral disease-modifying drug indicated for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) with potential anti-inflammatory and cytoprotective effects [1,2]. In phase III placebo-controlled studies, mean lymphocyte counts decreased by approximately 30% during the first year of DMF treatment, and 6% of patients receiving DMF experienced a decline in absolute lymphocyte counts (ALC) below 500/ μ l [3,4]. Although there was no increased incidence of serious infections observed in patients with ALC < 800 or 500/ μ l in clinical trials, rare cases of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) have occurred in the postmarketing setting in the presence of prolonged lymphopenia [5–7].

Current prescribing information recommends monitoring ALC during the treatment, and considering interruption of DMF in patients with ALC < 500 / μ l persisting for > 6 months [1]. Predicting which patients are at greater risk for developing severe lymphopenia may have important implications for clinical decisions, including disease-modifying therapy (DMT) selection and early treatment discontinuation for prevention of PML [8].

Lymphopenia occurs more likely in older patients, with lower baseline ALC, and those previously treated with natalizumab [8,9]. We aimed to explore additional risk factors for developing lymphopenia and to evaluate the effect of DMF on blood lymphocyte subsets as related to decline in ALC in patients with RRMS.

Abbreviations: DMF, dimethyl-fumarate; ALC, absolute lymphocyte count

* Corresponding author at: Department of Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Km. 9.100, 28034 Madrid, Spain.

E-mail address: susana.sainzdelamaza@salud.madrid.org (S. Sainz de la Maza).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Both authors were principal co-investigators.

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.007>

Received 28 March 2018; Received in revised form 16 December 2018; Accepted 7 January 2019

Available online 08 January 2019

0022-510X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Methods

2.1. Study design and population

This was a prospective longitudinal study of 106 consecutive RRMS patients treated with DMF at the MS Comprehensive Care Center at the Hospital Universitario Ramón y Cajal in Madrid, Spain. The study was approved by the local ethics committee. All patients signed a written informed consent form before inclusion.

2.2. Evaluation and follow-up

Clinical, MRI, and routine laboratory data, including ALC, were recorded at baseline. Patients were evaluated every 3 months thereafter to assess both the occurrence of relapses and the EDSS score. MRI scans were performed yearly after DMF initiation. Complete blood counts were compiled at each visit. Blood lymphocyte subsets were examined at baseline and six months thereafter, in a representative group of 64 patients.

Lymphopenia was classified according to NIH common terminology criteria for adverse events (CTCAE v4.0) as follows: grade 1 (ALC 800–999/ μ l), grade 2 (ALC 500–799/ μ l) and grade 3 (ALC < 500/ μ l) [10]. DMF was discontinued if ALCs fell below 500/ μ l for > 3 months, and lymphocyte counts were monitored until their recovery.

2.3. Flow cytometry studies

Heparinized whole blood was collected from each patient immediately before DMF initiation and after six months of treatment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained within 2 h by Ficoll density gradient centrifugation (Fresenius Kabi, Norway) and cryopreserved in aliquots of $5\text{--}6 \times 10^6$ cells until studied.

The following monoclonal antibodies were used in the blood lymphocyte subsets study: CD8-FITC, CD27-FITC, CD24-PE, CD197-PE (CCR7-PE), CD3-PerCP, CD38-PE-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD25-PE-Cy7, CD45RO-APC, CD56-APC, CD4-APC-H7, CD8-APC-H7, CD3-BV421, CD127-BV421, CD45-V500 (all from BD Biosciences, San Diego, CA).

Blood leukocyte subsets were studied by flow cytometry as previously described [11]. Briefly, for membrane antigen staining, 10^6 PMBC were labelled with the appropriate amounts of monoclonal antibodies, washed with PBS, and analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). According to the differential expression of several antigens, CD4+ and CD8+ T cells were classified as: naïve (CCR7+ CD45RO–); central memory (CM) (CCR7+ CD45RO+); effector memory (EM) (CCR7– CD45RO+); terminally differentiated (TD) (CCR7– CD45RO–). Regulatory CD4 T cells (Treg) were defined

as CD3+ CD4+ CD25hi CD127low. B cells were classified as: memory (CD19+ CD27dim CD38dim), plasmablasts (CD19+ CD27hi CD38hi); and CD27- regulatory cells (Breg) (CD19+ CD27- CD24hi CD38hi); CD56+ cells were subdivided into natural killer (NK) cells (CD56dim CD3–), natural killer T (NKT) cells (CD56dim CD3+), and CD56bright NK cells (CD3– CD56bright).

2.4. Statistical analysis

Analyses were performed using the Stata/IC Version 12.1 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

We used Fisher's exact test for categorical variables, and the Mann–Whitney *U* test for continuous ones. Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between baseline and follow-up data. *p* values were corrected using Bonferroni method.

A receiver operating characteristic (ROC) curve was generated to assess association between the decline in ALCs at three months of treatment and the subsequent development of lymphopenia. The optimal cut-off point was identified as the maximum point of the Youden index (specificity + sensitivity – 1). *p* values below 0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. Patients

106 consecutive patients (75.5% female) who received DMF treatment for 24.67 [6.03–34.63] months (median [range]) were included in the study. Age at treatment initiation was 41.5 ± 8.9 and the duration of the disease was 11.1 ± 8.2 years. Relapses in the last 12 months were 0.77 ± 0.73 and the EDSS score at baseline was 1.5 [0–7]. Seventy four patients received other previous disease modifying treatments (DMT).

3.2. Incidence of lymphopenia

A total of 37 (34.5%) patients developed some grade of lymphopenia, considering worst post-baseline ALC. The incidence of grade 1, 2 and 3 lymphopenia was 17.9% (19/106), 13.2% (14/106), and 5.7% (6/106), respectively. Baseline demographic and clinical characteristics of patients classified according to the development of lymphopenia are shown in Table 1. Patients who experienced lymphopenia were older at DMF initiation (45.2 vs. 39.5 years; $p = 0.001$) and had lower ALCs prior to treatment (1681 vs. 2195 cells/ μ l; $p = 0.002$). There were no other differences in basal characteristics of patients classified according to lymphopenia status.

Table 1
Baseline characteristics of patients treated with DMF classified according to the development of lymphopenia.

Variable	No lymphopenia (<i>n</i> = 69)	Lymphopenia (<i>n</i> = 37)	<i>p</i>
Age, <i>m</i> \pm SD (years)	39.5 \pm 9.9	45.2 \pm 5.0	0.001
Females, <i>n</i> (%)	50 (72.5)	30 (81.1)	NS
Time since first MS symptoms, <i>m</i> \pm SD (years)	10.4 \pm 8.0	12.4 \pm 8.1	NS
Previous DMT, <i>n</i> (%)			NS
None (treatment-naïve patients)	23 (33.3)	9 (24.3)	
Interferon beta/Glatiramer acetate	34 (49.3)	9 (24.3)	
Teriflunomide	2 (2.9)	0 (0)	
Natalizumab	5 (7.2)	2 (5.4)	
Fingolimod	4 (5.8)	2 (5.4)	
Others	1 (1.4)	2 (5.4)	
N. of relapses in the previous 12 months, <i>m</i> \pm SD	0.85 \pm 0.75	0.62 \pm 0.68	NS
EDSS score at baseline, median [range]	2.0 [0–6.5]	1.5 [1–7]	NS
N. of gadolinium-enhancing T1-weighted lesions, <i>m</i> \pm SD	1.47 \pm 3.89	0.34 \pm 0.84	NS
N. of hyperintense T2-weighted lesions, <i>m</i> \pm SD	25.3 \pm 15.2	24.1 \pm 14.9	NS
Baseline ALCs, <i>m</i> \pm SD (cells/ μ l)	2195 \pm 951	1681 \pm 477	0.002

ALCs: absolute lymphocyte counts; DMF: dimethyl fumarate; DMT: disease modifying therapy; *m* \pm SD: mean \pm standard deviation; MRI: magnetic resonance imaging; *n*: number; NS, non significant.

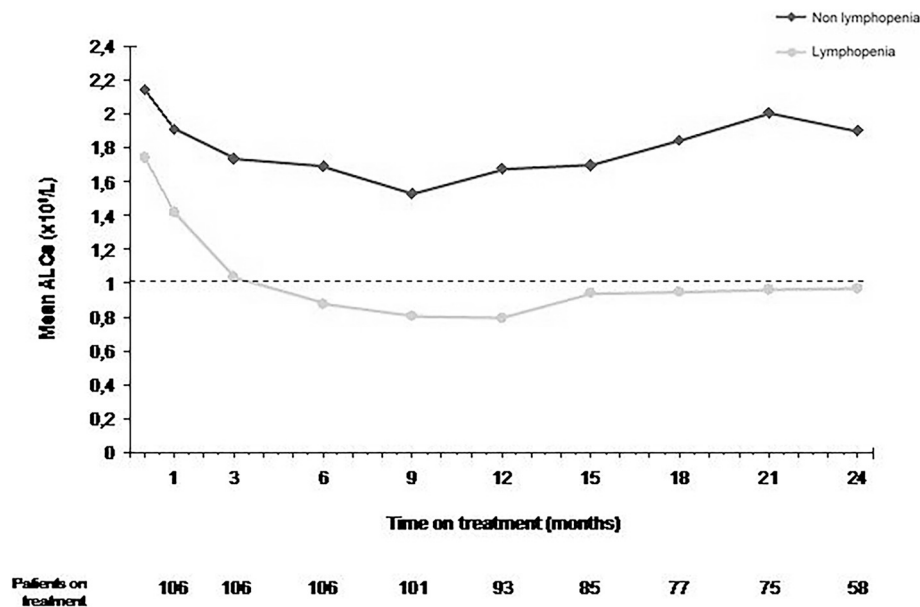


Fig. 1. Mean absolute lymphocyte count (ALCs) changes along dimethyl fumarate treatment in patients who developed (grey line) or not (black line) lymphopenia. It should be taken into account that dimethyl fumarate was discontinued in patients with grade 3 lymphopenia before month 12, so mean ALCs increase thereafter.

3.3. ALCs evolution during DMF treatment

Mean ALCs decreased by approximately 29% during the first year of treatment and then plateaued. Time until lymphopenia was identified ranged between one month to one year (median six months). Patients who subsequently developed lymphopenia experienced a higher decline in mean ALCs at three months of treatment than those who did not develop lymphopenia (41.4% vs. 15.5% decrease, $p = 0.0001$; Fig. 1). According to the range of lymphopenia the patients developed later, the rate of decrease in mean ALCs by month-3 was 25.6%, 38.1% and 50.7% for grade 1, grade 2 and grade 3 lymphopenia, respectively. Since DMF-associated PML has been described mainly in patients with grade 2–3 lymphopenia [5–7], we studied this group of patients separately. We found that they experienced a significantly greater decline in mean ALCs within three months of treatment than the rest of patients (44.9% vs. 19.9% decrease, $p = 0.001$). We analyzed this data using a ROC curve and established a cut-off value of 38% decrease in ALCs. Higher values were associated with subsequent appearance of grade 2–3 lymphopenia (OR = 5.93, 95% CI: 1.9–18.6, $p = 0.002$). DMF was discontinued in six patients with grade 3 lymphopenia. After that, lymphocyte counts gradually rose in all patients, but did not reach normal range until a median time of 150.5 days [range 76–256].

3.4. Effectiveness and safety of DMF according to the development of lymphopenia

Although assessment of effectiveness of DMF was not the main objective of the study, data on clinical and radiological disease activity was collected as part of routine clinical practice. In the course of the study, 6/37 (16.2%) lymphopenic patients and 13/69 (18.8%) non-lymphopenic patients experienced breakthrough disease activity, defined as a clinical relapse or appearance of new T2 or gadolinium enhancing lesions on follow-up MRI. No significant difference was observed between both groups.

Infections were not systematically queried, as evaluation of infection risk was not a part of the study. However, two of the six patients who developed grade 3 lymphopenia incidentally reported an infection while ALC < 500/ μ L; one patient developed herpes zoster involving right T5 dermatome, and the other patient developed bacterial pneumonia. Both of these were resolved after specific antimicrobial therapy.

3.5. Lymphocyte subsets in patients classified according to lymphopenia status

Percentages of blood lymphocyte subsets were studied in a representative group of 64 patients. Baseline clinical and demographic data of patients developing ($n = 24$) or not ($n = 40$) lymphopenia were similar to those observed in the whole group of patients (data not shown). There were no differences in basal leukocyte subsets between both groups of patients. Percentages of the different leukocyte subpopulations in basal and six months samples are shown in Table 2. All patients experienced a decrease in effector memory CD4+ and CD8+ T cells, in terminally differentiated CD8+ T cells, in total CD8+ T cells and in memory B cells, with no differences according to lymphopenia status. In addition, patients developing lymphopenia experienced a selective decrease in NKT cells ($p = 0.01$) which corresponded with a substantial decrease in the absolute numbers of these cells ($p < 0.0001$; Fig. 2A, B). Representative dot plots are shown in Fig. 2C and D.

In contrast, after 6 months of treatment non-lymphopenic patients experienced a relative increase in naïve CD4+ T cells ($p = 0.009$) not confirmed when absolute cell numbers were evaluated (data not shown).

4. Discussion

DMF is a new oral therapy recently approved for RRMS that induces a shift in the abnormal immune response observed in peripheral blood; it decreases effector subsets and increases regulatory ones, which is associated with an improvement of the disease course [11–17]. The most concerning adverse event of DMF is the decrease in lymphocyte counts, as prolonged severe lymphopenia has been related with rare cases of PML [5–7]. Thus, the identification of patients at risk of lymphopenia and the analysis of changes in the immune system associated with this phenomenon are of high clinical interest.

We studied 106 patients treated with DMF during a mean time of about two years in a university hospital. The reduction in mean ALCs (29%) and the percentage of patients with grade 3 lymphopenia (5.7%) were consistent with DMF placebo-controlled trials [3,4]. Patients who developed lymphopenia were older at DMF initiation and had lower ALCs prior to treatment, thus confirming previous reports [8,9]. We

Table 2
DMF induced changes in lymphocyte blood subsets.

Variable		No lymphopenia (n = 40)			Lymphopenia (n = 24)		
		Basal (M ± SEM)	6 Mo (M ± SEM)	p	Basal (M ± SEM)	6 Mo (M ± SEM)	p
Effector and memory subsets	CD4 + T	35.6 ± 1.5	37.9 ± 1.6	NS	31.4 ± 2.9	31.3 ± 2.9	NS
	CD4 + N	17.0 ± 1.4	22.1 ± 1.8	0.009	14.0 ± 2.2	21.1 ± 2.9	NS
	CD4 + CM	8.2 ± 0.6	7.8 ± 0.8	NS	6.8 ± 1.0	4.7 ± 0.7	NS
	CD4 + EM	8.1 ± 0.6	5.5 ± 0.5	< 0.0001	8.3 ± 1.0	3.9 ± 0.6	< 0.0001
	CD4 + TD	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	NS	2.3 ± 0.4	1.6 ± 0.3	NS
	CD8 + T	16.7 ± 1.2	13.9 ± 0.9	< 0.0001	14.9 ± 1.5	10.5 ± 1.1	< 0.0001
	CD8 + N	5.4 ± 0.7	6.5 ± 0.6	NS	3.8 ± 0.7	4.2 ± 0.5	NS
	CD8 + CM	0.7 ± 0.08	0.6 ± 0.08	NS	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	NS
	CD8 + EM	4.3 ± 0.6	2.3 ± 0.3	< 0.0001	4.1 ± 0.8	1.9 ± 0.4	0.015
	CD8 + TD	5.6 ± 0.9	4.3 ± 0.6	0.0015	5.6 ± 1.1	2.9 ± 0.7	0.0015
	NKT	2.5 ± 0.4	2.2 ± 0.4	NS	2.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	0.0105
	NK	12.2 ± 1.3	14.6 ± 1.7	NS	13.8 ± 2.7	11.0 ± 1.8	NS
	CD19+ T	8.5 ± 0.7	7.5 ± 0.6	NS	10.1 ± 1.5	10.6 ± 1.8	NS
	Bmem	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	< 0.0001	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.08	< 0.0001
Regulatory subsets	PB	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.03	NS	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	NS
	Treg	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	NS	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	NS
	Breg	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.02	NS	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.04	NS
	CD56 ^{bright}	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	NS	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	NS

Values are expressed as percentages of total peripheral blood mononuclear cells.

Breakdown of lymphopenic patients (n): Grade 1: 14; Grade 2: 7; Grade 3: 3. Bmem: Memory B cells; Breg: Regulatory B cells; CM: Central memory; DMF: Dimethyl fumarate; EM: Effector memory; M ± SEM: Mean ± Standard error of mean; Mo: Months; N: Naïve; NK: Natural Killer cells; NKT: Natural Killer T cells; NS: Not significant; PB: Plasmablast; T: Total; TD: Terminally differentiated; Treg: Regulatory T cells.

explored additional risk factors for DMF-related lymphopenia, and observed that patients who had > 38% reductions in ALCs at three months of treatment were 5.93-times more likely to develop subsequent grade 2–3 lymphopenia. Patients not experiencing a rapid decrease in ALCs during first three months of treatment are unlikely to have persisting lymphopenia thereafter. When validated in independent cohorts, this may be a useful and easy-to-use tool for early identification of

patients at a higher risk of subsequently developing lymphopenia.

Different investigations explored the mechanism of action of DMF by studying changes in peripheral blood cell profiles. It has been suggested that differential susceptibility of distinct lymphocyte subpopulations to DMF-induced apoptosis may contribute to efficacy and safety profile of this drug [18]. It was reported that patients treated with DMF showed a more significant reduction of CD8+ T cells as

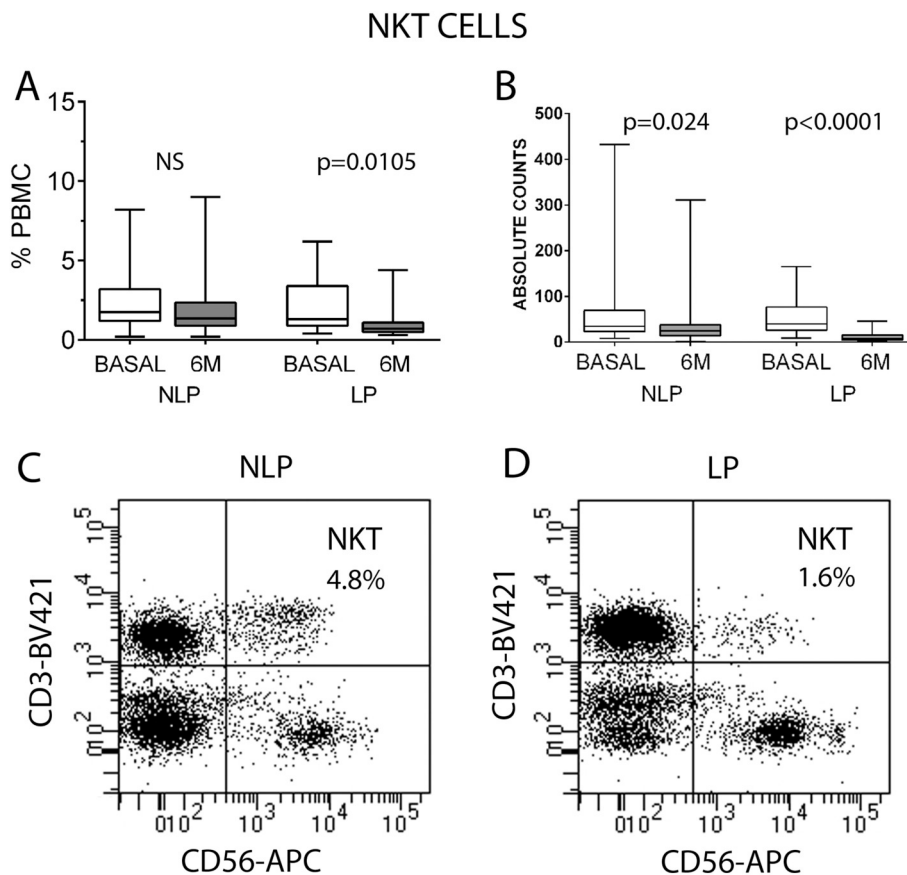


Fig. 2. A, B: Percentages (A) and absolute numbers (B) of Natural Killer T cells (NKT) shown by non-lymphopenic (NLP) or lymphopenic (LP) patients before (basal) and after 6 months (6 M) of dimethyl fumarate treatment. C, D: Representative dot plots showing NKT cells from a non-lymphopenic (NLP, C) and from lymphopenic patient (LP, D) after six months of treatment. Plots are gated on total peripheral blood mononuclear cells. Wilcoxon matched pair tests were used to assess differences between basal and 6M results. Breakdown of lymphopenic patients (n): Grade 1: 14; Grade 2: 7; Grade 3: 3. M: Months; NS: Non significant; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells.

compared to CD4+ T cells, and it is thought that viral infections may become more prevalent in the setting of this CD8+ T cells reduction [19–21]. In patients showing optimal response to this drug, a decrease in the percentage different effector lymphocyte subsets has been reported (mainly occurring in central memory T cells, memory B cells, and T and B cells producing IFN γ and TNF α respectively), as well as an increase in regulatory NK cells [11,15]. The lymphocyte subpopulations that diminish in lymphopenic patients were also studied, and significant reductions in CD4+ and CD8+ T cells have been observed [22].

We aimed to further characterize changes in lymphocyte subsets in DMF-treated patients who developed lymphopenia and observed that both, lymphopenic and non lymphopenic patients, showed a significant reduction in the percentages of some effector and memory lymphocyte subsets. Of note, a decrease in central memory CD4+ T cells or memory B cells, previously associated with optimal response to DMF [11], was similar in both groups of patients. This strongly suggests that lymphopenia status is independent of patient response to this drug, as we have observed in our study. However, some differences were found between lymphopenic and non lymphopenic individuals. The first group of patients experienced a specific decrease in NKT cell percentages which resulted in a large reduction of their absolute cell numbers. These cells can have a potential role in MS, since they can rapidly produce a variety of proinflammatory cytokines [23] and exhibit cytotoxic activity after activation [24]. However, their reduction is not associated with an optimal response to the drug [11]. It was described that CD8+ T cells clearly diminished in patients showing DMF associated lymphopenia [18,19]. We did not appreciate these variations in these cells within lymphopenic and non lymphopenic patients since both showed a considerable decrease. The great decrease on the NKT cell subset, which mostly expresses CD8, shown by lymphopenic patients may account for the differences in CD8 expressing T cells previously associated with this condition. Further research is needed to explore the clinical significance of this NKT reduction. Another difference we found in the population analysis was a relative increase of naïve CD4+ T cells after 6 months of treatment restricted to non lymphopenic patients, not confirmed when exploring absolute cell numbers, which shows that this relative increase may be a consequence of the decrease of other lymphoid populations.

The main limitation of our study is the low number of patients with grade 3 lymphopenia which makes it difficult to identify significant differences in the lymphopenic group. Nevertheless, our data provides an easy tool for the early identification of patients at risk of developing lymphopenia under DMF therapy. It shows that lymphopenia under this treatment is not associated with an indiscriminate reduction of B and T cells or with the efficacy of the drug, but probably relates to a loss of CD8+ expressing T cells, mostly NKT cells.

Conflicts of interest

LMV, LCF, SSM and JCA-C received payment for giving conferences, or travel expenses or research grants from Merck-Serono, Biogen, Sanofi-Genzyme, Roche, Bayer and Novartis. The remaining authors declare no conflicts of interest.

Funding statement

This work was supported by the Fondo para la Investigación Sanitaria [grant numbers PI15/00513 and RD16/0015/0001]. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Spain and FEDER.

Acknowledgements

Authors acknowledge MA Fernández de Pablos for her excellent technical support.

References

- [1] P. Albrecht, I. Bouchachia, N. Goebels, et al., Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation, *J. Neuroinflammation* 9 (2012) 163.
- [2] R.A. Linker, D.H. Lee, S. Ryan, et al., Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway, *Brain* 134 (2011) 678–692.
- [3] R. Gold, L. Kappos, D.L. Arnold, et al., Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 1098–1107.
- [4] R.J. Fox, D.H. Miller, J.T. Phillips, et al., Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 1087–1097.
- [5] M. Baharoori, J. Lyons, A. Dastagir, et al., Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 3 (2016) e274.
- [6] T. Rosenkranz, M. Novas, C. Terborg, PML in a patient with lymphocytopenia treated with dimethyl fumarate, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 1476–1478.
- [7] D.J. Nieuwkamp, J.L. Murk, B.W. van Oosten, et al., PML in a patient without severe lymphocytopenia receiving dimethyl fumarate, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 1474–1476.
- [8] E.E. Longbrake, R.T. Naismith, B.J. Parks, et al., Dimethyl fumarate-associated lymphopenia: risk factors and clinical significance, *Mult. Scler. J. Exp. Transl. Clin.* 1 (2015).
- [9] E.E. Longbrake, A.H. Cross, Dimethyl fumarate associated lymphopenia in clinical practice, *Mult. Scler.* 21 (2015) 796–797.
- [10] National Cancer Institute, Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0, NCI, NIH, HHS, NIH publication, Bethesda, MD, 2009, pp. #09–7473.
- [11] S. Medina, N. Villarrubia, S. Sainz de la Maza, et al., Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile, *Mult. Scler.* (2017), <https://doi.org/10.1177/1352458517717088>.
- [12] C.C. Gross, A. Schulte-Mecklenbeck, S. Klinsing, et al., Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 3 (2015) e183.
- [13] E.E. Longbrake, M.J. Ramsbottom, C. Antoni, et al., Dimethyl fumarate selectively reduces memory T cells in multiple sclerosis patients, *Mult. Scler.* 22 (2016) 1061–1070.
- [14] S.K. Lundy, Q. Wu, Q. Wang, et al., Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 3 (2016) e211.
- [15] V. Fleischer, M. Friedrich, A. Rezk, et al., Treatment response to dimethyl fumarate is characterized by disproportionate CD8+ T cell reduction in MS, *Mult. Scler.* (2017), <https://doi.org/10.1177/1352458517703799>.
- [16] R. Gold, G. Giovannoni, J.T. Phillips, et al., Sustained effect of delayed-release dimethyl fumarate in newly diagnosed patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: 6-year interim results from an extension of the DEFINE and CONFIRM studies, *Neurol. Ther.* 5 (2016) 45–57.
- [17] R. Gold, D.L. Arnold, A. Bar-Or, et al., Long-term effects of delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis: interim analysis of ENDORSE, a randomized extension study, *Mult. Scler.* 23 (2017) 253–265.
- [18] M. Ghadiri, A. Rezk, R. Li, et al., Dimethyl fumarate-induced lymphopenia in MS due to differential T-cell subset apoptosis, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 4 (2017) e340.
- [19] C.M. Spencer, E.C. Crabtree-Hartman, K. Lehmann-Horn, et al., Reduction of CD8(+) T lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2 (2015) e76.
- [20] B.O. Khatri, J. Garland, J. Berger, et al., The effect of dimethyl fumarate (Tecfidera) on lymphocyte counts: a potential contributor to progressive multifocal leukoencephalopathy risk, *Mult. Scler. Relat. Disord.* 4 (2015) 377–379.
- [21] R. Berkovich, L.P. Weiner, Effects of dimethyl fumarate on lymphocyte subsets, *Mult. Scler. Relat. Disord.* 4 (2015) 339–341.
- [22] C. Chaves, R. Ganguly, C. Ceresia, et al., Lymphocyte subtypes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate, *Mult. Scler. J. Exp. Transl. Clin.* 3 (2017) (2055217317702933).
- [23] J. Gumperz, S. Miyake, T. Yamamura, M. Brenner, Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 625–636.
- [24] V.V. Parekh, S. Lalani, L. Van Kaer, The in vivo response of invariant natural killer T cells to glycolipid antigens, *Int. Rev. Immunol.* 26 (2007) 31–48.

DR. JUAN PABLO CUELLO (Orcid ID : 0000-0003-0209-8227)

DR. ROBERTO ALVAREZ-LAFUENTE (Orcid ID : 0000-0002-3132-1486)

MISS AMALIA TEJEDA VELARDE (Orcid ID : 0000-0002-7061-8725)

DR. LUISA M VILLAR (Orcid ID : 0000-0002-9067-3668)

Article type : Original Article

NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN LEVELS IN PREGNANT MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS: A PROSPECTIVE COHORT STUDY

Authors:

Juan Pablo Cuello¹, MD; Maria Luisa Martínez Ginés¹, MD; Jens Kuhle³, MD; José Manuel García Domínguez¹, MD; Alberto Lozano Ros¹, MD; Fernando Romero Delgado¹, MD; Yolanda Higuera¹, MD, PhD; Ariana Meldaña Rivera¹, PhD; Haydee Goicochea Briceño¹, PhD; Santiago García-Tizon Larroca¹, MD; Juan de-León Ruiz¹, MD, PhD; Zuzanna Michalak³, MD; Christian Barro³, MD; Roberto Álvarez Lafuente⁴, MD, PhD; Silvia Medina Heras², MD; Juan Ignacio Fernández Velasco², MD; Amalia Tejeda-Velarde², MD; Maria Inmaculada Domínguez-Mozo⁴, PhD; Alfonso Muriel², PdD; Clara de Andrés¹, MD; Luisa Maria Villar², MD, PhD.

Authors affiliations:

1- Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España. C/ Dr. Esquerdo 46, Madrid. Spain. Tel/Fax: +34-915868339

2.Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España.

3-Neurologic Clinic and Policlinic, Departments of Medicine, Biomedicine and Clinical Research, University Hospital Basel, University of Basel, Switzerland

4-Grupo de Investigación de Esclerosis Múltiple. Instituto de investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC) / Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Search Terms: 1-Multiple sclerosis, 2-pregnancy, 3-neurofilament, 4-light chain, 5-puerperium.

Running title: NEUROFILAMENT LEVELS DURING PREGNANCY IN MULTIPLE SCLEROSIS

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/ene.13965

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Publication History: This manuscript was not published previously

Study Funded by biogen®

Authors financial Disclosures:

- Juan Pablo Cuello reports no disclosures
- María Luisa Martínez Ginés, MD; reports no disclosures
- Jens Kuhle, MD; received speaker fees, research support, travel support, and/or served on advisory boards byECTRIMS, Swiss MS Society, Swiss National Research Foundation, (320030_160221), University of Basel, Bayer, Biogen, Genzyme, Merck, Novartis, Protagen AG, Roche, Teva.
- José Manuel García Domínguez, MD; reports no disclosures
- Alberto Lozano Ros, MD; reports no disclosures
- Fernando Romero Delgado, MD; reports no disclosures
- Yolanda Higuera, MD, PhD; reports no disclosures
- Ariana Meldaña Rivera, MD; reports no disclosures
- Haydee Goicochea Briceño, MD; reports no disclosures
- Santiago Garcia Tizon, MD; reports no disclosures
- Juan de-Leon Ruiz, MD, PhD; reports no disclosures
- Zuzanna Michalak, MD; reports no disclosures
- Christian Barro, MD; reports no disclosures
- Roberto Álvarez Lafuente, MD, PhD; reports no disclosures
- Silvia Medina Heras, MD; reports no disclosures
- José Ignacio Fernández Velasco, MD; reports no disclosures
- Amalia Tejeda-Velarde, MD; reports no disclosures
- Maria Inmaculada Domínguez-Mozo, MD; reports no disclosures
- Alfonso Muriel, PhD; reports no disclosures
- Clara de Andrés, MD; reports no disclosures
- Luisa Maria Villar, MD, PhD; reports no disclosures

Corresponding Author:

Juan Pablo Cuello

Hospital General Gregorio Marañón.

Neurology Department. Calle Dr. Esquerdo 46, Madrid. Spain

Tel/Fax: +34-915868339

juancuelloneuro@gmail.com

NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN LEVELS IN PREGNANT MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS: A PROSPECTIVE COHORT STUDY

Abstract:

Background: Neurofilament light chain (NfL) is a cytoskeletal protein of neurons. Its levels are increasingly recognized as measures of neuroaxonal damage. The aim of this study was to explore serum NfL (sNfL) levels in MS patients and healthy controls during pregnancy and puerperium.

Methods

Prospective, longitudinal, single-center study. sNfL concentration was assessed using a highly sensitive single-molecule array during pregnancy and in puerperium, in a cohort of 39 pregnant patients with relapsing multiple sclerosis (P-MS). Twenty-one healthy pregnant women (HPW) served as control groups. Eight R-MS patients suffered relapses during pregnancy (P-MS-R) in the first or second trimesters.

Results:

No differences in pregnancy and delivery data were observed between P-MS and HPW. P-MS patients showed higher sNfL values than HPW in the first trimester, independently of the presence ($p=0.002$) or not ($p=0.02$) of relapses during pregnancy. However, in the third trimester, only P-MS-R showed higher sNfL values than HPW ($p=0.001$). These differences extended to the puerperium, where P-MS-R showed higher sNfL values than those with no relapses during gestation ($p=0.02$).

Conclusion:

These data strongly suggest that sNfL levels reflect MS activity during pregnancy. Additionally, the absence of relapses during pregnancy may have a beneficial effect on neurodegeneration during puerperium.

NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN LEVELS IN PREGNANT MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS: A PROSPECTIVE COHORT STUDY

Introduction

The annualized relapse rate (ARR) is reduced during pregnancy in MS, especially during the third trimester, whilst it is temporarily increased during puerperium¹. In spite of this, pregnancy does not seem to affect disability progression in the long term. However, to what extent pregnancy itself and the occurrence of relapses during pregnancy and puerperium is associated with neuro-axonal injury is yet to be determined. It is also necessary to investigate if reducing the AAR during pregnancy and postpartum could associate a better long-term outcome.

Neurofilaments are highly specific structural neuronal proteins composed by heteropolymers of Nf-heavy, Nf-medium, and Nf-light (NfL) polypeptides together with alpha-internexin in the CNS². CSF NfL quantification is considered a specific biomarker for neuroaxonal injury in different neurologic diseases, which include MS, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative disorders, and acute brain and spinal cord injury³⁻⁵. Recently, a new method has been developed to measure serum NfL (sNfL), using highly sensitive single-molecule array (Simoa) technology^{6,7}. It has been shown in several studies that sNfL levels are closely associated with CSF NfL values, arguing for a release within the central nervous system^{6,8}.

In MS, sNfL associates with disability and disease activity and predicts patient outcome^{9,10}. However, little is known about the levels of this protein during pregnancy. We aimed to explore sNfL levels during pregnancy and puerperium in MS cohort and to assess if they associated with disease activity.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This was a prospective, longitudinal study conducted at Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain) between January 2007 and July 2017. During the study period, 58 patients with MS had a pregnancy in our center and were examined for eligibility. We consecutively included the 43 patients who gave their informed consent to participate. Three patients were lost during follow-up, and additional five with missing blood samples were excluded. We finally included 39 pregnant MS patients (P-MS). MS was diagnosed according to McDonald criteria^{11,12}. As control group, we included 21 healthy age-matched pregnant women (HPW).

Pregnant MS patients were clinically evaluated every trimester and at puerperium, with additional visits in case of suspected relapse. At first visit, demographic and clinical variables including age, disease duration, reproductive history, clinical form of MS, annualized relapse rate (ARR) before pregnancy, disability status according to the EDSS scale¹³, and previous treatments were recorded. During the follow up we monitored disease activity by exploring changes in the EDSS score and the presence of relapses. Relapses were defined as the appearance or worsening of focal neurological dysfunction of more than 24 hours of duration, in the absence of fever or signs of infection. The Ethics Committee of our center approved the study protocol and written informed consent was obtained from all participating women.

Samples

Serum samples of MS and healthy pregnant women were obtained during the first (weeks 8-12) and third (weeks 29-37) trimesters and within the first trimester postpartum (P). After collection, samples were aliquoted and stored at -80°C until analysis. The sNfL concentration was determined using a highly sensitive single-molecule array (Simoa) assay⁶. Neurologists were blind to laboratory results during the study.

Statistical analyses

Descriptive and multivariate analysis were performed. The results of the continuous variables were presented as median and interquartile range 25%-75% (IQR). Analyses were made using the Mann-Whitney U test or Chi-square test for categorical analysis. All analyses were conducted with STATA statistical package, and p values below 0.05 were considered significant.

Results

Thirty-nine consecutive pregnancies in patients with relapsing MS and 21 healthy pregnant women were analyzed. Baseline clinical characteristics of the MS group is shown in Table 1. No differences in pregnancy and delivery data were observed between both groups, except for a higher percentage of primiparous in the control group (Table 2).

Twenty-one (53%) of the pregnant MS had received previous DMT, which were suspended at pregnancy desire in 14 cases (median washout time: 34 weeks, IQR: 11-57). In the remaining seven cases DMT was maintained until the positive pregnancy test and then stopped (Table 3). The P-MS group was subdivided into two subgroups according to the presence of relapses during pregnancy: 8 (20%) patients suffered relapses (P-MS-R), and 31 (80%) did not (P-MS-NR). Relapses occurred in the first trimester in five patients, in the second trimester in one, and both first and second trimesters in two patients (Table 3).

sNFL values of the different groups are depicted in Figure 1. p values lower than 0.05 are shown. MS patients showed higher sNFL levels than HPW in the first trimester, independently of the presence (p=0.002) or not (p=0.02) of relapses during pregnancy. However, in the third trimester, only MS women who suffered relapses showed higher NfL values compared to HPW group (p=0.001).

We next explored NfL values during puerperium. Both relapsing ($p=0.04$) and non-relapsing ($p=0.02$) MS patients showed higher sNfL values than healthy women at that point, being levels higher in P-MS-R than in P-MS-NR ones ($p=0.02$), thus showing that the beneficial effect of having no relapses during pregnancy extended to the post-partum period.

Discussion

High sNfL levels are increasingly recognized as measures of acute or chronic neuroaxonal damage^{5,14}. In MS, they are affected by the EDSS score and the occurrence of relapses, while storage time and sex do not influence sNfL levels^{6,10}. Thus, sNfL measurement can be used to indicate recent neuronal damage or silent clinical activity.

sNfL levels increase during pregnancy in healthy women, have a positive correlation with maternal age, and can be significantly higher in preclampsia¹⁵. However, there is a lack of published information about sNfL in MS and the putative correlation with clinical activity during gestation. We aimed to explore this by measuring the concentration of this protein in MS patients during pregnancy and post-partum, using as control group age-matched pregnant healthy women. No MS patient showed pre-eclampsia during pregnancy, so our results were not affected by this factor.

In the first trimester of pregnancy, sNfL values were higher in MS patients compared to healthy women. These data agree with prior reports indicating that the protective effect of pregnancy in MS is higher at the third trimester of gestation¹. By contrast, in the third trimester, changes in this protein associated with the patient's clinical status. Hence, patients suffering relapses (all of them occurred within first and second trimesters) experienced a clear increase compared to healthy women at that point. However, those not suffering relapses during pregnancy showed sNfL values similar to those of healthy women. These data confirm the protective effect of pregnancy in MS during the third trimester of gestation, with this protection being abrogated in case of relapses during pregnancy. Of note, the increase showed by P-MS-R was evident at the third trimester of

pregnancy, more than three months after the last relapse occurred, and in the postpartum period.

An association of NFL levels with MS attacks was previously described, with values normalized three months after relapses⁶. Our data showing a more prolonged increase in sNFL values after relapses in pregnant MS women may indicate an extended axonal injury, possibly due to the lack of any disease-modifying therapy during this period. Reducing relapses during pregnancy and puerperium can result in a better long-term benefit, mostly by lowering the axonal damage. However, the best strategy to reduce the relapse rate in this context is yet to be established. Published data showed that the relapse rate during pregnancy is higher nowadays, mostly because of DMT cessation and long washout periods before pregnancy¹⁶. On the other hand, there is an increasing clinical experience in the use of some DMT during pregnancy, although the long-term safety is unknown¹⁷⁻²³. When planning a pregnancy in MS patients, the best strategy may be achieved by a personalized DMT washout cessation before conception, and even by establishing in which cases it is preferable to maintain the safest DMT options throughout the pregnancy in patients at highest risk.

Although these results should be validated in multi-center cohorts, our data strongly suggest that during pregnancy, sNFL levels in MS patients depend on their clinical status. High values at the third trimester may indicate the presence of silent clinical activity during pregnancy. These data could give a clue for future clinical decisions in pregnant MS patients.

Funding: This study was supported by Biogen®

Declaration of conflicting interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

Bibliography:

1. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, et al. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 285–291.
2. Yuan A, Rao MV, Veeranna null, et al. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125: 3257–3263.
3. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2012; 18: 552–556.
4. Bielekova B, McDermott MP. Will CSF biomarkers guide future therapeutic decisions in multiple sclerosis? *Neurology* 2015; 84: 1620–1621.
5. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2018; 1.
6. Disanto G, Barro C, Benkert P, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81: 857–870.
7. Gisslén M, Price RW, Andreasson U, et al. Plasma Concentration of the Neurofilament Light Protein (NFL) is a Biomarker of CNS Injury in HIV Infection: A Cross-Sectional Study. *EBioMedicine* 2016; 3: 135–140.
8. Barro C, Leocani L, Leppert D, et al. Fluid biomarker and electrophysiological outcome measures for progressive MS trials. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2017; 23: 1600–1613.
9. Disanto G, Adiutori R, Dobson R, et al. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87: 126–129.
10. Barro C, Benkert P, Disanto G, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 2018; 141: 2382–2391.
11. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the ‘McDonald Criteria’. *Ann Neurol* 2005; 58: 840–846.
12. Sadaka Y, Verhey LH, Shroff MM, et al. 2010 McDonald criteria for diagnosing pediatric multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2012; 72: 211–223.
13. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452.
14. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2014; 13: 113–126.
15. Evers KS, Atkinson A, Barro C, et al. Neurofilament as Neuronal Injury Blood Marker in Preeclampsia. *Hypertens Dallas Tex* 1979 2018; 71: 1178–1184.
16. Alroughani R, Alowayesh MS, Ahmed SF, et al. Relapse occurrence in women with multiple sclerosis during pregnancy in the new treatment era. *Neurology* 2018; 90: e840–e846.

17. Haghikia A, Langer-Gould A, Rellensmann G, et al. Natalizumab use during the third trimester of pregnancy. *JAMA Neurol* 2014; 71: 891–895.
18. Hellwig K, Haghikia A, Gold R. Pregnancy and natalizumab: results of an observational study in 35 accidental pregnancies during natalizumab treatment. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2011; 17: 958–963.
19. Thiel S, Langer-Gould A, Rockhoff M, et al. Interferon-beta exposure during first trimester is safe in women with multiple sclerosis-A prospective cohort study from the German Multiple Sclerosis and Pregnancy Registry. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2016; 22: 801–809.
20. Fragoso YD, Boggild M, Macias-Islas MA, et al. The effects of long-term exposure to disease-modifying drugs during pregnancy in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115: 154–159.
21. Giannini M, Portaccio E, Ghezzi A, et al. Pregnancy and fetal outcomes after Glatiramer Acetate exposure in patients with multiple sclerosis: a prospective observational multicentric study. *BMC Neurol* 2012; 12: 124.
22. Sandberg-Wollheim M, Neudorfer O, Grinspan A, et al. Pregnancy Outcomes from the Branded Glatiramer Acetate Pregnancy Database. *Int J MS Care* 2018; 20: 9–14.
23. Lu E, Dahlgren L, Sadovnick A, et al. Perinatal outcomes in women with multiple sclerosis exposed to disease-modifying drugs. *Mult Scler J* 2012; 18: 460–467.

Figure 1:

Title: sNfL levels during pregnancy and puerperium pregnant MS patients and healthy controls.

Figure 1 footnote:

1T: first trimester

3T: third trimester

P-MS-R: Pregnant multiple sclerosis group. Relapse during pregnancy

P-MS-NR: Pregnant multiple sclerosis group. No relapse during pregnancy

HPW: healthy pregnant women

Table 1:

Title: Baseline clinical characteristics of MS patients

Table 1 footnote:

ARR: annualized relapse rate

EDSS: Expanded disability status score

IQR: interquartile range

P-MS: pregnant multiple sclerosis group

Table 2:

Title: Reproductive and obstetric information

Table 2 footnote:

GA: gestational age

HCF: healthy pregnant women

IQR: interquartile range

P-MS: pregnant multiple sclerosis group

Table 3

Title: Treatment status prior pregnancy in MS patients

Table 3 footnote:

APD: at pregnancy desire

APT: at positive pregnancy test

ARR: annualized relapse rate

DMT: disease modifying treatment

NA: not-applicable

P-MS-R: Pregnant multiple sclerosis group. Relapse during pregnancy

P-MS-NR: Pregnant multiple sclerosis group. No relapse during pregnancy

IQR: interquartile range

sNfL: Serum neurofilament light chain

Table 1: Baseline clinical characteristics of MS patients

	P-MS (n: 39)
Age (years, median [IQR])	33 (31-36)
Disease duration (years)	9 (5-13)
ARR two years before pregnancy (median [IQR])	0.6 (0.3-0.8)
EDSS score	1 (0-1)
Time from last relapse until NfL determination (months)	22 (15.7-42.5)

Table 2: Reproductive and obstetric information

	P-MS (n: 39)	HPW (n: 21)	p value
Age (y) (median [IQR])	33 (31-36)	35 (30-37)	0.6
Abortion history	14 (35%)	4 (19%)	0.15
Primiparous	9 (23%)	8 (38%)	0.04
Delivery mode: Vaginal	33 (84%)	18 (85%)	0.7
GA at birth, weeks (median [IQR])	39 (38-40)	39 (38-40)	0.8
Birthweight in g (median [IQR])	3,145 (2717-3462)	3,150 (2330-3600)	0.6

Table 3: Treatment status prior pregnancy in MS patients

	P-MS-R (n: 8)	P-MS-NR (n: 31)	p value
Age (years, median [IQR])	32 (30-32)	34 (31-37)	0.1
ARR one year before pregnancy (median [IQR])	0.5 (0-1)	0.5 (0-1)	0.3
Time from last relapse until sNfL determination (months)	20 (11-48)	22 (16-42)	0.5
<u>Treatment Status:</u>			
Treatment naïve. n (%)	3 (40%)	15 (50%)	0.1
Patients on DMT before pregnancy. n (%)	5 (60%)	16 (50%)	0.2
<u>Treatment cessation:</u>			
First line treatment:	APD :2 / APT:1	APD: 12 / APT: 4	0.09
Second line treatment	APT: 2 (40%)	NA	0.09

